

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

DANIELI ISABEL ROMANOVITCH RIBAS

ESTUDO DE MUTAÇÕES DO GENE *CFTR* E DA CONCENTRAÇÃO SÉRICA DA
LECTINA LIGANTE DE MANOSE (MBL) EM CRIANÇAS COM FIBROSE CÍSTICA
IDENTIFICADAS PELA TRIAGEM NEONATAL

CURITIBA

2014

DANIELI ISABEL ROMANOVITCH RIBAS

ESTUDO DE MUTAÇÕES DO GENE *CFTR* E DA CONCENTRAÇÃO SÉRICA DA
LECTINA LIGANTE DE MANOSE (MBL) EM CRIANÇAS COM FIBROSE CÍSTICA
IDENTIFICADAS PELA TRIAGEM NEONATAL

Tese apresentada ao Curso de Pós Graduação em Medicina Interna, setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Medicina Interna.

Orientador: Prof. Dr. Nelson Augusto Rosário Filho
Coorientador (a): Prof. Dra. Lilian Pereira Ferrari

CURITIBA

2014

Ribas, Danieli Isabel Romanovitch

Estudo de mutações do gene CFTR e da concentração sérica da lectina ligante de manose (MBL) em crianças com fibrose cística identificadas pela triagem neonatal / Danieli Isabel Romanovitch Ribas. -- Curitiba, 2014.

97 f.; il.; 30 cm.

Orientador: Prof. Dr. Nelson Augusto Rosário Filho

Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Lilian Pereira Ferrari

Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Medicina Interna. Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná.

1. Fibrose Cística. 2. Triagem Neonatal. 3. Lectina ligante de manose
I. Rosário Filho, Nelson Augusto. II. Título.

NLM WI 820



Ministério da Educação
Universidade Federal do Paraná
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA
= MESTRADO e DOUTORADO =

PARECER

Aos dezenove dias do mês de dezembro do ano de dois mil e quatorze, a banca examinadora constituída pelos Professores: Dra. Liya Regina Mikami (UNIBRASIL), Dra. Lilian Pereira Ferrari (UNIBRASIL), Dr. Salmo Raskin (PUC), Dra. Carolina Prando (Instituto de Pesquisa Pelé Pequeno Príncipe), Dr. Nelson Augusto do Rosário Filho (UFPR) – Orientador, exarou o presente parecer sobre a tese elaborada por **DANIELI ISABEL ROMANOVITCH RIBAS** do **Programa de Pós-Graduação em Medicina Interna - Doutorado da Universidade Federal do Paraná**, intitulada: **“ESTUDO DE MUTAÇÕES DO GENE CFTR E DA CONCENTRAÇÃO SERICA DA LECTINA LIGANTE DE MANOSE (MBL) EM CRIANÇAS COM FIBROSE CÍSTICA IDENTIFICADAS PELA TRIAGEM NEONATAL”**. A Banca examinadora considerou que a aluna apresentou trabalho adequado para tese e o defendeu com segurança e propriedade nas arguições que lhe foram feitas, de modo a merecer a sua **aprovação** sendo recomendado à Universidade Federal do Paraná que lhe seja concedido o título **de Doutora em Medicina Interna**. A banca considerou o trabalho de grande relevância à Saúde Pública, e recomendam a publicação de artigo em revista técnico-científica com corpo editorial, depois de incorporadas às sugestões apresentadas no decurso das arguições, cumpridas outras exigências previstas em normativas da pós-graduação.

Professora Dra. Liya Regina Mikami

Professora Dra. Lilian Pereira Ferrari

Professora Dra. Carolina Prando

Professor Dr. Salmo Raskin

Professor Dr. Nelson Augusto do Rosário Filho

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por tornar tudo isso possível.

À minha família pelo amor e sacrífico e por saberem entender minha ausência.

Aos pacientes com Fibrose Cística e seus pais que acreditaram em nosso estudo, sem os quais este trabalho seria impossível.

Aos meus orientadores, professor Dr. Nelson Augusto Rosário Filho e professora Dra. Lilian Pereira Ferrari. Obrigada por estarem ao meu lado, acreditando em mim, me guiando com dedicação, sabedoria e paciência.

À Professora Dra. Liya Regina Mikami, pelo carinho, ensinamentos e por me auxiliar em todas as etapas deste trabalho.

Ao Professor Dr. Carlos Antônio Riedi pela contribuição no aprendizado.

Aos professores Dra. Iara de Messias-Reason e Dr. Renato Nisihara pela disponibilidade, auxílio e colaboração.

À Professora Ms. Cintia Regina Félix de Oliveira, minha amiga, que sempre esteve ao meu lado, me ajudando e acreditando que tudo seria possível.

À Cleonice Garbuio Bortoli, pela sua imprescindível colaboração, dedicação e por estar sempre disposta em me ajudar.

Ao Willian dos Santos, Lisangela Cristina de Oliveira, Camila D.B. Piragine, Edilcéia D. A. Ravazzani, por me auxiliarem em momentos importantes.

À Professora Dra. Vanda Cristina Galvão Pereira por toda sua compreensão, carinho e incentivo durante todo este período.

Aos técnicos responsáveis pelos laboratórios das Faculdades Integradas do Brasil (UniBrasil).

À Professora Dra. Ana T. B. Guimarães, pela disponibilidade, atenção e por me auxiliar na análise estatística dos dados.

À coordenação do programa de Pós-Graduação em Medicina Interna e Ciências da Saúde.

À todos aqueles que diretamente ou indiretamente me ajudaram, incentivaram e me aconselharam.

*“Mesmo que tu já tenhas feito uma longa caminhada
há sempre um caminho a fazer.”
(Santo Agostinho)*

RESUMO

A fibrose cística é uma doença hereditária autossômica recessiva, causada por mutações no gene *CFTR* (*Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*). Apresenta grande variação clínica, mesmo entre pacientes com o mesmo genótipo, sugerindo que outros fatores genéticos e/ou ambientais possam estar influenciando em seu curso, principalmente em relação à doença pulmonar. Um destes fatores é a lectina ligante de manose (MBL), proteína com importante papel na primeira linha de defesa do sistema imune inato, cuja deficiência aumenta a suscetibilidade para diferentes doenças infecciosas, principalmente a patógenos extracelulares. O estudo teve como objetivo analisar a frequência de mutações do gene *CFTR* e das concentrações séricas de MBL em crianças com fibrose cística identificadas pela triagem neonatal. Foram avaliadas 51 crianças com diagnóstico confirmado de fibrose cística, de ambos os gêneros, euro descendentes, identificadas pela triagem neonatal e acompanhadas no período de fevereiro de 2010 a janeiro de 2011. Foi coletada amostra sanguínea para extração de DNA e análise da concentração sérica de MBL. O DNA foi submetido à amplificação por PCR, e avaliado por eletroforese em gel de poliacrilamida (12%) ou agarose (2%) de acordo com o tamanho do fragmento. A concentração sérica de MBL foi determinada por meio de imunoensaio enzimático. Dos 102 alelos estudados, 84 (82,4%) correspondiam as mutações estudadas, sendo as maiores frequências observadas para *p.Phe508del* (38,2%) e *p.Gly542X* (26,5%). As mutações *p.Asn1303lys*, *p.Lys684serfsX38* e *p.Arg1162X* foram detectadas em 9 (8,8%), 5 (4,9%) e 4 (3,9%) alelos respectivamente. Houve predomínio do genótipo *p.Gly542X/outra* mutação (29,4%), seguido dos genótipos *p.Phe508del/p.Phe508del* (21,6%) e *Phe508del/outra* (17,7%). Destaca-se ainda o genótipo *p.Phe508del/p.Gly542X* (15,7%). Observou-se valores superiores para as mutações *p.Gly542X* e *p.Asn1303lys* em relação ao descrito na literatura ($p < 0,05$). Não foi encontrada relação entre as infecções de vias aéreas superiores e inferiores e microbiota do escarro com os genótipos determinados ($p > 0,05$). Em relação a MBL não foram encontradas diferenças estatísticas entre o grupo de crianças com fibrose cística e controles, assim como não foram encontradas relações entre os níveis de MBL e infecções de vias aéreas superiores e inferiores, microbiota do escarro e os genótipos *CFTR* pesquisados. Este estudo caracteriza-se por ser inédito no estado do Paraná em se tratando de análise de mutações do gene *CFTR* em crianças fibrocísticas triadas ao nascimento, e sugere que pacientes portadores da mutação *p.Gly542X* vinham a óbito antes mesmo do diagnóstico clínico da doença subestimando a frequência real desta mutação e consequente subdiagnóstico.

Palavras chaves: fibrose cística, triagem neonatal, lectina ligante de manose.

ABSTRACT

Cystic fibrosis is an autosomal recessive disorder caused by mutations in the CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator) gene. It has great clinical variation, even among patients with the same genotype, suggesting that other genetic and / or environmental factors may be influencing its course, primarily in relation to pulmonary disease. One of these factors is the mannose binding lectin (MBL) protein with an important role in the first line of defense of the innate immune system, whose deficiency increases susceptibility to various infectious diseases, primarily extracellular pathogens. The present study aimed to analyze the frequency of mutations in the CFTR gene and serum MBL concentrations in children with cystic fibrosis identified by newborn screening. Fifty one children with a confirmed diagnosis of cystic fibrosis, of both genders, euro descendants, identified by newborn screening and followed up from February 2010 to January 2011. We collected blood sample for DNA extraction and analysis of serum MBL. The DNA was subjected to PCR, and evaluated by electrophoresis in polyacrylamide gel (12%) or agarose (2%). The serum concentration of MBL was determined by using enzyme immunoassay. Of 102 alleles studied, 84 (82.4%) were detected, with the highest frequency observed for *p.Phe508del* (38.2%) and *p.Gly542X* (26.5%). The *p.Asn1303lys*, *p.Lys684serfsx38* and *p.Arg1162X* mutations were detected in 9 (8.8%) 5 (4.9%) and 4 (3.9%) alleles respectively. There was a predominance of genotype *p.Gly542X* / other mutation (29.4%), followed by genotypes *p. Phe508del* / w. *Phe508del* (21.6%) and *Phe508del* / other (17.7%). Another highlight is the genotype *p.Phe508del* / *p.Gly542X* (15.7%). We observed higher values for *p.Gly542X* and *p.Asn1303lys* mutations compared to that described in the literature ($p < 0,05$). No relationship between infections of upper and lower airways and sputum microorganisms with certain genotypes ($p > 0,05$) was found. Regarding MBL no statistical differences were found between the group of children with cystic fibrosis and controls, as well as no relationship between levels of MBL and infections of upper and lower airway microorganisms of sputum and CFTR genotypes studied were found. This study is unique in Paraná in the case of analysis of fibrocystic children screened at birth and suggests that patients with the mutation *p.Gly542X* died even before the clinical diagnosis of the disease providing under diagnosis and led to underestimation of the actual frequency of this mutation in Paraná.

Key words: cystic fibrosis, neonatal screening, mannose binding lectin.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – LOCALIZAÇÃO DO GENE <i>CFTR</i> NO CROMOSSOMO 7.....	17
FIGURA 2 – GENE <i>CFTR</i> E PROTEÍNA CFTR E SUA POSIÇÃO NA CÉLULA	18
FIGURA 3 – ESTRUTURA DA PROTEÍNA CFTR E SUA POSIÇÃO NA CÉLULA ..	19
FIGURA 4 – CLASSES DAS MUTAÇÕES DO GENE <i>CFTR</i> E MECANISMO FUNCIONAL DA PROTEÍNA	26
FIGURA 5 – VIAS DE ATIVAÇÃO DO SISTEMA COMPLEMENTO.....	32
FIGURA 6 – VIA DAS LECTINAS	34
FIGURA 7 – ESTRUTURA MOLECULAR DA MBL.	35
FIGURA 8 – FORMA OLIGOMÉRICA DA MBL	36
FIGURA 9 – ESTRUTURA DO GENE <i>MBL2</i>	37
FIGURA 10 - PADRÃO ESPERADO DE ELETROFORESE PARA A MUTAÇÃO <i>p. Arg1162X</i> DO GENE <i>CFTR</i> APÓS DIGESTÃO ENZIMÁTICA	48
FIGURA 11 – PADRÃO ESPERADO DE ELETROFORESE PARA A MUTAÇÃO <i>p.Lys684serfsX38</i> DO GENE <i>CFTR</i> APÓS DIGESTÃO ENZIMÁTICA	49
FIGURA 12 – PADRÃO ESPERADO DE ELETROFORESE PARA A MUTAÇÃO <i>p.Phe508del</i> DO GENE <i>CFTR</i> APÓS DIGESTÃO ENZIMÁTICA	50
FIGURA 13 – PADRÃO ESPERADO DE ELETROFORESE PARA A MUTAÇÃO <i>p.Asn1303lys</i> DO GENE <i>CFTR</i>	51
FIGURA 14 – PADRÃO ESPERADO DE ELETROFORESE PARA A MUTAÇÃO <i>p.Gly542X</i> DO GENE <i>CFTR</i>	51

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 - MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DA FC.....	21
QUADRO 2 – SOLUÇÕES UTILIZADAS PARA EXTRAÇÃO DE DNA	45
QUADRO 3 – INICIADORES UTILIZADOS NAS REAÇÕES PCR PARA ANÁLISE DAS MUTAÇÕES	46
QUADRO 4 – PROGRAMA DE PCR PARA O GENE <i>CFTR</i>	47
QUADRO 5 – VALORES DE REFERÊNCIA DAS VARIÁVEIS PESO, IDADE E IMC EM RELAÇÃO À IDADE PARA CRIANÇAS.....	53

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA DO ESTUDO.....	56
TABELA 2 – FREQUÊNCIAS ABSOLUTAS E RELATIVAS DAS MUTAÇÕES DO GENE <i>CFTR</i> NO SOMATÓRIO DOS ALELOS I E II, FREQUÊNCIAS RELATIVAS ESPERADAS OBTIDAS NA LITERATURA ESPECÍFICA.....	57
TABELA 3 – FREQUÊNCIAS ABSOLUTAS E RELATIVAS DO GENE <i>CFTR</i> NA COMBINAÇÃO ENTRE OS ALELOS I E II	58
TABELA 4 - MANIFESTAÇÕES RESPIRATÓRIAS DOS PARTICIPANTES DO ESTUDO NO PERÍODO ENTRE FEVEREIRO DE 2010 E JANEIRO DE 2011	59
TABELA 5 – MICROBIOTA DO ESCARRO REFERENTE AO PERÍODO DE FEVEREIRO DE 2010 E JANEIRO DE 2011	60
TABELA 6 – INFECÇÕES RESPIRATÓRIAS (PNEUMONIA E IVAS) EM RELAÇÃO AOS GENÓTIPOS DO GENE <i>CFTR</i>	60
TABELA 7 – MÉDIA E DESVIO PADRÃO REFERENTE A MICROBIOTA DO ESCARRO EM FUNÇÃO DO GENÓTIPO DO GENE <i>CFTR</i>	61
TABELA 8 – CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE MBL EM CRIANÇAS COM FIBROSE CÍSTICA E CONTROLES.....	62
TABELA 9 – CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE MBL EM CRIANÇAS COM FIBROSE CÍSTICA COM E SEM INFECÇÕES DE VIAS AEREAS SUPERIORES (IVAS) E PNEUMONIA (PN).....	63
TABELA 10 – CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE MBL EM CRIANÇAS COM FIBROSE CÍSTICA EM RELAÇÃO AOS PATÓGENOS IDENTIFICADOS NA MICROBIOTA DO ESCARRO	64
TABELA 11 – CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE MBL EM CRIANÇAS COM FIBROSE CÍSTICA EM RELAÇÃO AOS GENÓTIPOS <i>CFTR</i>	65

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

cAMP – Monofosfato de adenosina cíclico

cBc - *Complexo da Burkholderia cepacia*

CFD – Cystic Fibrosis Database

CFF- Cystic Fibrosis Foundation

CGT – Bases nitrogenadas citosina, guanina e timina

CFTR - Gene que codifica para a proteína CFTR

CFTR - Proteína reguladora de condutância transmembrânica

CTT – Bases nitrogenadas citosina, timina, timina

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

EDTA – Ácido etileno diamina

ELISA – Ensaio imunoenzimático

GAA – Bases nitrogenadas guanina, adenina, adenina

GAC – Bases nitrogenadas guanina, adenina e citosina

GGA – Bases nitrogenadas guanina, guanina e adenina

GGC – Bases nitrogenadas guanina, guanina, citosina

FC - Fibrose Cística

HC - Hospital de Clínicas

HCl – Ácido clorídrico

HC-UFPR - Hospital das Clínicas da Universidade Federal do Paraná

IgM – Imunoglobulina classe M

IgG – Imunoglobulina classe G

IL – Interleucina

IMC – Índice de massa corpórea

IVAS – Infecções de vias aérea superiores

KCl – Cloreto de potássio

MASP - Serina proteases associada a lectina ligante de manose

MBL2 – Gene que codifica para a proteína MBL

MBL - Lectina ligante de manose

MgCl₂ – Cloreto de magnésio

MSD – Domínio transmembrana

NaCl – Cloreto de sódio

NBD – Domínio de ligação de nucleotídeo

pb – pares de base

PCR – Reação em cadeia da polimerase

PN – Pneumonia

p.Arg553X - mutação do gene *CFTR*, nomenclatura tradicional R553X

p.Arg1162X - mutação do gene *CFTR*, nomenclatura tradicional R1162X

p.Asn1303lys - mutação do gene *CFTR*, nomenclatura tradicional N1303K

p.Gly542X - mutação do gene *CFTR*, nomenclatura tradicional G542X

p.Gly551Asp – mutação do gene *CFTR*, nomenclatura tradicional G551D

p.Lys684serfsX38 - mutação do gene *CFTR*, nomenclatura tradicional 2183AA>G

p.phe508del – mutação do gene *CFTR*, nomenclatura tradicional F508del

p.Trp1282X - mutação do gene *CFTR*, nomenclatura tradicional W1282X

TBE – Solução de Tris, ácido bórico e EDTA

TEMED – Tetrametiletilenodiamina

TGT – Bases nitrogenadas timina, guanina, timina

TIR - Tripsina imunorreativa

TKM1 – Solução de Tris, cloreto de potássio, cloreto de magnésio e EDTA

TKM2 - Solução de Tris, cloreto de potássio, cloreto de magnésio, cloreto de sódio e EDTA

TNF - Fator de necrose tumoral

UV – Ultravioleta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVOS	16
2.1 OBJETIVO GERAL	16
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
3 REVISÃO DE LITERATURA	17
3.1 FIBROSE CÍSTICA	17
3.1.1 Incidência	19
3.1.2 Manifestações clínicas	20
3.1.3 Diagnóstico	23
3.1.4 Mutações <i>CFTR</i>	25
3.1.4.1 Mutação <i>p.Phe508del</i>	27
3.1.4.2 Mutação <i>p.GlyG542X</i>	28
3.1.4.3 Mutação <i>p.Asn1303lys</i>	28
3.1.4.4 Mutação <i>p.Arg1162X</i>	28
3.1.4.5 Mutação <i>p.Lys684serfsX38</i>	29
3.1.5 Relação genótipo e fenótipo	29
3.2 SISTEMA COMPLEMENTO	30
3.2.1 Via das lectinas	33
3.2.1.1 Lectina ligante de manose	34
3.2.1.2 Estrutura molecular da MBL	35
3.2.1.3 Genética olecular	37
3.3 DOENÇAS ASSOCIADAS A MBL	38
3.3.1 MBL e fibrose cística	40
4 MÉTODOS	42
4.1 TIPO DO ESTUDO	42
4.2 LOCAL	42
4.3 POPULAÇÃO E AMOSTRA	42
4.3.1 Critérios de inclusão	42
4.3.2 Critérios de exclusão	42

4.3.3 Grupo controle.....	43
4.4 DELINEAMENTO	43
4.4.1 Coleta de sangue	43
4.4.2 Extração de DNA.....	43
4.4.3 Genotipagem dos alelos do gene <i>CFTR</i>	45
4.4.3.1 Reação em cadeia da polimerase com sequência específica de primer .	45
4.4.3.2 Eletroforese em gel de agarose.....	48
4.4.3.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida.....	49
4.4.4 Análise das manifestações clínicas respiratórias	52
4.4.5 Análise da microbiota do escarro	52
4.4.6 Obtenção do peso, altura e índice de massa corpórea (IMC)	52
4.4.7 Quantificação sérica de MBL dos pacientes e controles	53
4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	54
5 RESULTADOS.....	56
6 DISCUSSÃO	66
7 CONCLUSÃO	72
REFERÊNCIAS.....	73
ANEXOS	86
APÊNDICES	87

1 INTRODUÇÃO

A Fibrose Cística (FC) é uma doença genética incidente em europeus e seus descendentes e sua prevalência varia de acordo com a localização geográfica. Mundialmente 70.000 indivíduos apresentam FC (CFF, 2010) e com o diagnóstico precoce, proporcionado pela triagem neonatal, associado à boa adesão ao tratamento, a sobrevida média destes indivíduos tem aumentado, passando de 2 anos na década de 50 para 30 a 40 anos atualmente (CAMARGOS *et al.*, 2000; RIBEIRO *et al.*, 2002; RATJEN e DORING, 2003; ALVAREZ *et al.*, 2004; SANTOS *et al.*, 2005; SIMS *et al.*, 2005; STRAUSBAUGH *et al.*, 2007, CASTRO e FIRMIDA, 2011).

Em 1985 o gene da FC foi localizado no cromossomo 7 e em 1989 foi clonado, sequenciado, e sua mutação mais frequente mundialmente, a *p.phe508del*, identificada (KEREM, B.S. *et al.*, 1989b; RIORDAN *et al.*, 1989; ROMMENS *et al.*, 1989). Investigações anteriores evidenciaram que as mutações causadoras de FC existem desde o período Paleolítico (50000 anos) e muitas estão fortemente associadas com populações derivadas da Europa (MORRAL *et al.*, 1994).

As mutações de maiores frequências na Europa são a *p.Phe508del* (66,8%), *p.Gly542X* (2,6%), *p.Asn1303lys* (1,6%), *p.Gly551Asp* (1,5%) e a *p.Trp1282X* (1,0%). As demais apresentam frequências entre 0,1 e 0,9% e destas, as mais encontradas, são *1717-1G→A* (0,83%), *p.Arg553X* (0,75%), *p.Arg1162X* (0,51%), *621+1G→T* (0,54%) e a *p.Lys684serfsx38* (0,36%) (ESTIVILL *et al.*, 1997).

No Brasil, em virtude do grande número de imigrantes europeus, principalmente italianos, a incidência das mutações da FC apresenta forte influência europeia (FAUCZ *et al.*, 2007).

Por ser uma doença complexa, com envolvimento de múltiplos órgãos a relação entre o genótipo e a gravidade da doença é variável e depende do órgão afetado (GEBOREK e HJELTE, 2011). A doença pulmonar, principal causa de morbidade e mortalidade, apresenta grande variabilidade fenotípica e é

caracterizada por infecção crônica por agentes patogênicos típicos, tais como *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Burkholderia cepacia* (GRAVINA *et al.*, 2014).

Pelo fato da doença pulmonar ser pouco relacionada com os genótipos *CFTR*, acredita-se que fatores ambientais e genes modificadores estejam influenciando no quadro clínico pulmonar da doença de indivíduos com o mesmo genótipo (ROWNTREE e HARRIS, 2003; GRAVINA *et al.*, 2014).

Um dos primeiros genes considerados como candidato a modificador da FC foi o gene *MBL2*, responsável pela formação da proteína MBL (lectina ligante de manose), a qual faz parte do sistema imune inato e desempenha papel importante na primeira linha de defesa contra microrganismos (GARRED *et al.*, 1999, TURNER, 1996; FUJITA *et al.*, 2004; KAMESH *et al.*, 2007; Ip *et al.*, 2009).

Mutações no gene *MBL2* irão ocasionar baixas concentrações séricas da proteína promovendo diminuição ou ausência da ativação da via da lectina do complemento, aumentando, desta forma, a suscetibilidade a infecções (SILVA e MOTA, 2003; HICKLING *et al.*, 2004; SHARON, 2008; TRINDADE *et al.*, 2008). Na infância, a diminuição desta proteína está associada a infecções graves e a um risco relativo maior (cerca de duas vezes) de infecções do trato respiratório superior em crianças menores de dois anos de idade (KOCH *et al.*, 2001).

Considerando que a triagem neonatal favorece o diagnóstico precoce da FC e que a função pulmonar de crianças fibrocísticas pode ser modificada pelo gene *MBL2*, este estudo foi realizado com o intuito de analisar a frequência das mutações *p.Phe508del*, *p.Gly542X*, *p.Arg1162X*, *p.Asn1303lys* e *pLys684serfsX38* do gene *CFTR* e das concentrações séricas da MBL e relacioná-los com as manifestações clínicas pulmonares em um grupo de crianças com diagnóstico confirmado de FC e triadas ao nascimento.

A escolha das cinco mutações deu-se por as mesmas apresentarem frequências significativas na Europa, principalmente na Itália, país responsável pelo grande número de imigrantes da região sul do Brasil e pelo fato, de que, até a presente data, apenas o estudo Perone *et al.*, (2010) foi realizado com crianças triadas ao nascimento no estado de Minas Gerais (MG).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Analisar a frequência de mutações do gene *CFTR* e da concentração sérica da lectina ligante de manose (MBL) em crianças com Fibrose Cística identificadas pela triagem neonatal.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a frequência das mutações *p.Phe508del*, *p.Gly542X*, *p.Arg1162X*, *p.Asn1303lys* e *p.Lys684serfsX38* do gene *CFTR* e compará-la com a literatura específica;
- Identificar as manifestações clínicas respiratórias das crianças com fibrose cística;
- Determinar a prevalência de infecções de vias aéreas superiores (IVAS) e inferiores e relacioná-las com os genótipos identificados;
- Relacionar a microbiota do escarro das crianças com fibrose cística com os genótipos identificados;
- Determinar e comparar as concentrações séricas da MBL em crianças com fibrose cística e controles saudáveis;
- Relacionar as concentrações séricas da MBL com as IVAS e inferiores, com a microbiota do escarro e com os genótipos do gene *CFTR* identificados.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 FIBROSE CÍSTICA

A Fibrose Cística (FC) é uma doença genética autossômica recessiva grave, multissistêmica, comum em eurodescendentes. É causada por mutações no gene *CFTR* localizado no braço longo do cromossomo 7, mapeado no *loco* 31.2 (7q31.2) (FIGURA 1) (KEREM *et al.*, 1989; ROMMENS *et al.*, 1989; RIORDAN *et al.*, 1989, ZIELENSKI e TSUI, 1995).

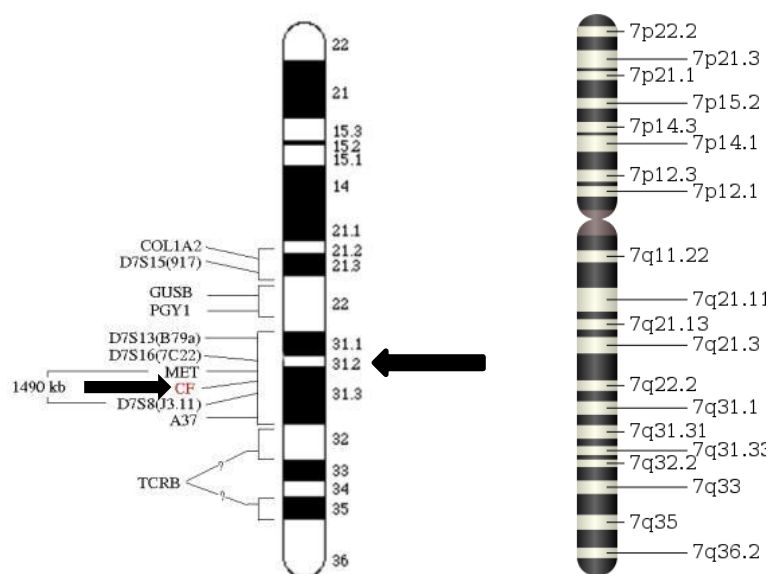


FIGURA 1 – LOCALIZAÇÃO DO GENE *CFTR* NO CROMOSSOMO 7

FONTE: TIZZANO E BUCHWALD (1992)

O gene *CFTR* é constituído de aproximadamente 250 kb que se estendem em 27 éxons e é responsável pela codificação de uma glicoproteína de 1480 aminoácidos, denominada CFTR (*Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*) (FIGURA 2) (KEREM, 1989 *et al.*, 1989; ROMMENS *et al.*, 1989; RIORDAN *et al.*, 1989, ZIELENSKI e TSUI, 1995).

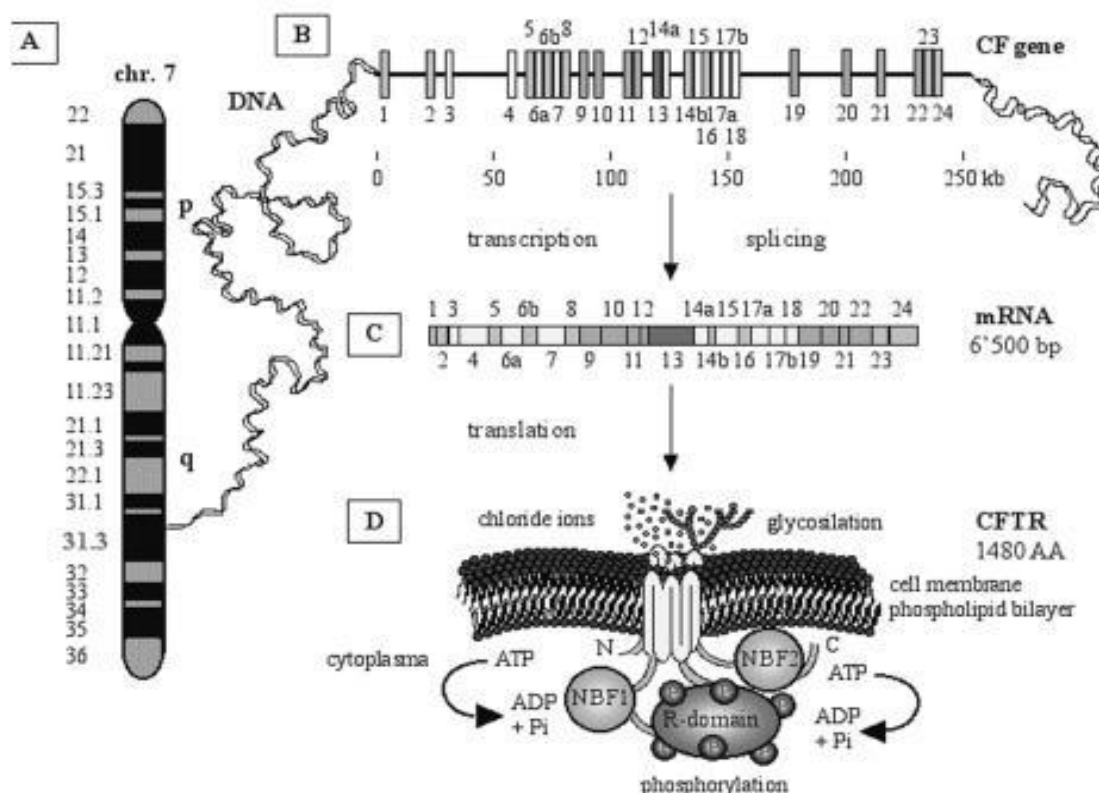


FIGURA 2 – GENE *CFTR* (B) E PROTEÍNA CFTR (C) E SUA POSIÇÃO NA CÉLULA (D)
 FONTE: ZIELENSKI e TSUI, 1995.

A proteína CFTR é formada por dois domínios transmembrana (MSD), dois domínios de ligação de nucleotídeo (NBD), e um domínio regulador central (R) (FIGURA 3) (RIORDAN *et al.*, 1989; ZIELENSKI, 2000). Seu funcionamento adequado é dependente do monofosfato de adenosina cíclico (cAMP) (RIORDAN *et al.*, 1989; AKABAS, 2000; RODRIGUES, 2008, ZIELENSKI, 2000). Em situações normais, posiciona-se na membrana celular das células epiteliais dos pulmões, intestino, pâncreas, fígado, sistema reprodutivo e glândulas sudoríparas, e funciona como um canal de cloro, mantendo o equilíbrio eletrolítico da célula, favorecendo o transporte de íons de cloro para o meio extracelular e a inibição da entrada de íons de sódio para o meio intracelular (LI e NAREN, 2005, HUFFMYER *et al.*, 2009; LUBAMBA *et al.*, 2012).

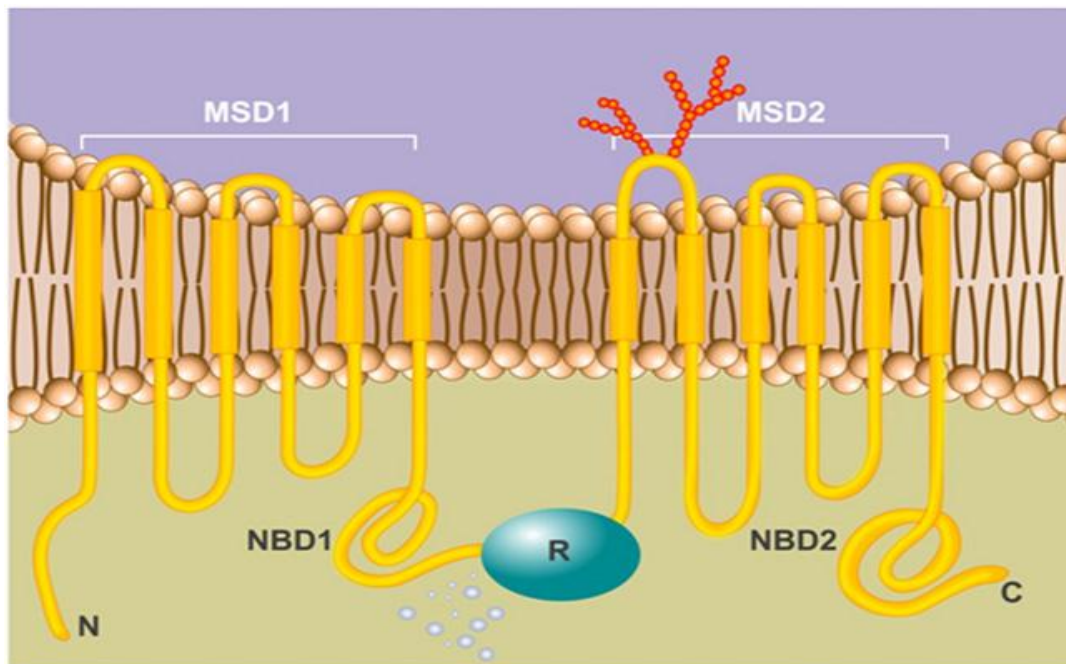


FIGURA 3 - ESTRUTURA DA PROTEÍNA CFTR E SEU POSICIONAMENTO NA CÉLULA

FONTE: LUBAMBA *et al.*, (2012)

Mutações no gene *CFTR* promovem a perda total ou parcial da função da proteína CFTR, causando redução na excreção do cloro através da membrana apical das células epiteliais e consequente aumento da absorção de sódio, elevando, desta forma, a eletronegatividade e promovendo o desequilíbrio osmótico, o qual contribui para a desidratação das secreções, formando um muco extracelular espesso, desidratado e viscoso que favorece a obstrução dos ductos que eliminam as secreções, reação inflamatória e fibrose (ACKERMAN e CLAPHAM, 1997; QUINTON, 1999, RIBEIRO *et al.*, 2002; ROWE *et al.*, 2005; RODRIGUES, 2008). A FC na sua forma típica é caracterizada pela tríade doença pulmonar obstrutiva crônica, quadro de má absorção e alterações eletrolíticas do suor.

3.1.1 Incidência

De acordo com a Cystic Fibrosis Foudation (2010), mundialmente, 70.000 indivíduos apresentam Fibrose Cística (FC) e sua prevalência varia de acordo com a localização geográfica e antecedentes étnicos, sendo maior em indivíduos europeus e seus descendentes (KEREM *et al.*, 1989; ESTIVILL *et al.*, 1997; BOBADILLA *et al.*, 2002; PROSAD *et al.*, 2010; LUBAMBA *et al.*, 2012).

É uma doença comum no norte da Europa, ocorrendo em aproximadamente 1:2500 e 1:5000 nascimentos sem predomínio entre os gêneros, o que estabelece uma frequência de um portador para cada 25-50 indivíduos na população em geral (OLIVER *et al.*, 2009). No Brasil estima-se que sua incidência seja de 1:7500 eurobrasileiros e 1:15300 afrobrasileiros (RASKIN *et al.*, 2007; RASKIN *et al.*, 2008).

Na região Sul do Brasil sua incidência varia de 1:7000 nascidos vivos no Paraná (FEPE-PR, 2014), 1:12195 em Santa Catarina e 1: 1587 no Rio Grande do Sul, decrescendo em direção à região Sudeste e Norte do País, para cerca de 1: 10000 (RASKIN, *et al.*, 2008).

3.1.2 Manifestações Clínicas

As manifestações clínicas na FC são oriundas do comprometimento dos órgãos em que a proteína CFTR é expressa (pulmões, intestino, pâncreas, fígado, sistema reprodutivo e glândulas sudoríparas) e nem todos os indivíduos apresentam respostas clínicas semelhantes (RIBEIRO *et al.*, 2002).

Manifestações como obstrução crônica das vias aéreas, insuficiência pancreática exócrina, cirrose biliar, diminuição da motilidade intestinal, infertilidade masculina e elevados níveis de eletrólitos no suor fazem parte das manifestações comumente encontradas na FC (AKABAS, 2000; RODRIGUES, 2008; HUFFMYER *et al.*, 2009) (QUADRO 1).

LOCAL	MANIFESTAÇÕES
Pulmões	Hipertrofia celular, secreção viscosa, diminuição do clearance muco ciliar, atelectasias, colonizações bacterianas, hipertensão pulmonar e cor pulmonale.
Pâncreas	Deficiência pancreática exócrina, redução do volume e pH das secreções, retenção de enzimas digestivas.
Fígado	Infiltração de gordura no fígado, cirrose, hipertensão portal.
Gastrointestinal	Síndrome de obstrução intestinal distal, episódios recorrentes de obstrução intestinal, dor abdominal, distensão, náuseas, vômitos.
Genitourinária	Início tardio da puberdade, infertilidade masculina, diminuição da fertilidade feminina, ciclos menstruais normais e/ou alterados.
Glândulas sudoríparas	Suor salgado

QUADRO 1 – MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS NA FC
 FONTE: ADAPTADO DE HUFFMYER *et al.*, (2009)

Dentre todas as manifestações clínicas, as pulmonares são a maior causa de morbidade e mortalidade, apresentando maior variabilidade no fenótipo da FC e caracterizando - se pela colonização e infecção respiratória por bactérias que levam a dano tissular irreversível (RIBEIRO *et al.*, 2002; CUTTING, 2005).

O transporte iônico alterado no epitélio pulmonar favorece a produção de muco desidratado, tornando-o de 30 a 60 vezes mais espesso que o normal. Com o aumento da viscosidade ocorre maior aderência do muco na superfície do epitélio pulmonar, prejudicando o transporte mucociliar e contribuindo para a dilatação brônquica irreversível (bronquiectasias), inflamação e infecção pulmonar crônica, que irá se estabelecer de acordo com a idade e evolução da doença, por bactérias como *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas aeruginosa mucoide*, *Burkholderia cepacia* e fungos

(PUCHELLE *et al.*, 2002; BUSH, 2002; RIBEIRO *et al.*, 2002; CHMIEL e DAVIES, 2003; GOSS e QUITTNER, 2007, BOYLE, 2007; DALCIN *et al.*, 2008).

Staphylococcus aureus e *Haemophilus influenzae* são encontrados precocemente, antes mesmo do aparecimento dos sintomas (RIBEIRO *et al.*, 2002). Em estudo realizado por Souza *et al.*, (2006) o *Staphylococcus aureus* foi o primeiro patógeno isolado, sendo também a bactéria de maior ocorrência e com o maior número de amostras positivas por pacientes.

Pseudomonas aeruginosa contribui para uma progressiva deterioração da função pulmonar e diminuição da sobrevida, podendo esta ser de 2,6 vezes maior quando a colonização ocorre nos primeiros cinco anos (OLIVER *et al.*, 2009), porém, o pior prognóstico da doença relaciona-se com a colonização por *Burkholderia cepacia* (CORREIA *et al.*, 2008).

O processo inflamatório e a infecção crônica resultam em sintomas como a tosse e a expectoração, marcados por períodos de piora aguda, além da formação de pólipos e sinusite (GOSS, 2007).

A maioria dos fibrocísticos apresenta bronquiolite, pneumonia de repetição e otite média crônica ou recorrente. Nas fases avançadas da doença é possível observar complicações como hemoptise recorrente, atelectasias, empiema, enfisema progressivo, pneumotórax, fibrose pulmonar e *cor pulmonale*. Além de cianose periungueal e baqueteamento digital acentuado (RIBEIRO *et al.*, 2002).

O comprometimento da CFTR no pâncreas ocasiona aumento da viscosidade e redução da alcalinização das secreções pancreáticas o que favorece a obstrução dos ductos pancreáticos levando à retenção das enzimas digestivas e consequente má digestão de lipídios e proteínas, deficiências de vitaminas e de ácidos graxos essenciais, que irão contribuir para o baixo peso corporal e atraso no crescimento. A insuficiência pancreática ocorre em aproximadamente 90% dos casos e alguns indivíduos podem desenvolver diabetes mellitus devido à fibrose das ilhotas de Langerhans (NTIMBANE *et al.*, 2008; PERRETTI *et al.*, 2005).

A manifestação gastrointestinal pode estar associada ou não à insuficiência pancreática e a manifestação mais precoce é o íleo meconial, detectado em 10%

a 15% dos pacientes. Neste processo, pelo ressecamento do bolo fecal, não ocorre a eliminação de mecônio (primeiras fezes), resultando em acúmulo de material espesso no íleo terminal e distensão abdominal. Em pacientes adultos pode ocorrer a síndrome da obstrução intestinal distal, que acomete a porção distal do íleo, em decorrência da má digestão (BLACKMAN *et al.*, 2006; BOYLE, 2007; DALCIN *et al.*, 2008).

Em torno de 25% dos casos de FC apresentam comprometimento hepatobiliar, variando conforme a idade. A alteração do funcionamento da CFTR nas células epiteliais dos ductos biliares promove alteração na hidratação da bile a qual causa sedimentação nos ductos e inflamação crônica podendo evoluir para cirrose hepática (CUTTING, 2005).

Em relação ao sistema reprodutor, 90% dos homens apresentam infertilidade em consequência da ausência bilateral dos canais deferentes e a azoospermia obstrutiva (BOYLE, 2007; HUFFMYER *et al.*, 2009). Porém, na maioria dos casos, a espermatogênese não está comprometida, possibilitando a realização de técnicas de reprodução assistida (JARZABEK *et al.*, 2004). Nas mulheres é possível verificar muco cervical espesso o que favorece a diminuição da fertilidade, além de órgãos reprodutivos com tamanho diminuído e amenorreia, a qual pode estar relacionada com o baixo peso (HODGES *et al.*, 2008; HUFFMYER *et al.*, 2009). Quando apresentam um bom quadro pulmonar e nutricional a gestação pode ocorrer sem intercorrências (JARZABEK *et al.*, 2004).

Em virtude do não funcionamento do canal CFTR nas glândulas sudoríparas não ocorre reabsorção do sódio e do cloro, mantendo o suor com alta concentração de íons, tornando o suor salgado, podendo colaborar para desidratação ou alcalose metabólica hipoclorêmica (MISHRA *et al.*, 2005).

3.1.3 Diagnóstico

Com a ampliação das doenças pesquisadas pelo Programa Nacional de Triagem Neonatal (PNTN) em 2001, a FC passou a ser rastreada, no Brasil, pelo “teste do pezinho” (LUZ *et al.*, 2008) e o Estado do Paraná foi pioneiro na

realização da triagem neonatal para FC (outubro de 2001), seguido por Santa Catarina (março de 2002) e Minas Gerais (junho de 2003) (SANTOS *et al.*, 2005; PERONE *et al.*, 2010).

Para o rastreio da FC, é utilizada a dosagem quantitativa do tripsinogênio imunorreativo (IRT). Em neonatos com FC estará aumentada em razão do bloqueio dos ductos pancreáticos. O teste deve ser realizado na primeira semana de vida e é considerado positivo quando o valor for superior ou igual a 70 ng/mL. O mesmo deve ser repetido após 15 a 30 dias para confirmação. Em casos positivos os neonatos são encaminhados para realizar o teste do suor (MISHRA *et al.*, 2005; SANTOS *et al.*, 2005; FARRELL, *et al.*, 2008; CASTELLANI *et al.*, 2009; REIS e DAMACENO, 1998; RIBEIRO *et al.*, 2002; DALCIN e ABREU, 2008; FARRELL *et al.*, 2008).

O teste do suor é considerado o padrão ouro para o diagnóstico da FC e apresenta valores superiores a 95% de especificidade e sensibilidade. O suor é estimulado pelo método da iontoforese por pilocarpina de acordo com os procedimentos de Gibson-Cooke ou pelo sistema de coleta de suor Macroduct (Wescor, Logan, UT, USA). A amostra de suor obtida é analisada para a concentração de cloro e sódio, o cloreto fornece a melhor discriminação diagnóstica enquanto o sódio é útil para o controle de qualidade (RIBEIRO *et al.*, 2002; BOECK *et al.*, 2005; DALCIN e ABREU, 2008; CASTELLANI *et al.*, 2009).

Quando a concentração de cloro apresentar valores menores ou iguais a 39 mmol/L o teste é considerado negativo para FC, valores entre 40 e 59 mmol/L são intermediários (duvidosos) e valores iguais ou superiores a 60mmol/L são considerados positivos para FC (FARRELL *et al.*, 2008).

O diagnóstico somente é confirmado com dois testes do suor positivos realizados em momentos distintos. Os casos duvidosos, identificados pelo teste do suor, podem ser confirmados por meio do estudo genético ou pelo teste de diferença de potencial nasal (RIBEIRO *et al.*, 2002; DALCIN e ABREU, 2008, FARRELL *et al.*, 2008).

O estudo genético é realizado por métodos de análise direta do gene *CFTR* e de acordo com o American College of Medical Genetics (ACMG) recomenda-se

que sejam rastreadas as 25 mutações mais comuns causadoras da doença. Em decorrência do grande número de mutações conhecidas, apresenta alta especificidade, porém baixa sensibilidade (RIBEIRO *et al.*, 2002; DALCIN e ABREU, 2008, FARRELL *et al.*, 2008; CASTELLANI *et al.*, 2008). Os fibrocísticos poderão apresentar uma mesma mutação nos dois alelos do gene *CFTR*, considerados homozigotos, ou duas mutações diferentes, denominados heterozigotos compostos (BOECK *et al.*, 2005).

O teste de diferença de potencial nasal mede o fluxo de íons sódio e cloro através da mucosa nasal, o qual gera um potencial basal que em indivíduos normais está em equilíbrio. Na FC, em virtude da impermeabilidade da membrana celular aos íons, ocorre desequilíbrio iônico e consequentemente aumento do potencial basal. Recomenda-se a realização de pelo menos dois testes em momentos diferentes. A ausência do aumento do potencial nasal não exclui o diagnóstico de fibrose cística, pois a presença de inflamação no epitélio poderá gerar falsos negativos (DALCIN e ABREU, 2008).

3.1.4 Mutações *CFTR*

A maioria das mutações do gene *CFTR* envolve três ou menos nucleotídeos e pode ocorrer pela substituição de nucleotídeo (*missense*), deleção de pares de bases, inserção ou deleção de uma base na sequência do DNA resultando em deslocamento do códon de leitura durante a tradução (*frameshift*), formação de um códon de parada prematuro (*nonsense*) ou alteração do local de splicing (CFDB, 2014; LUBAMBA *et al.*, 2012). Encontram-se localizadas ao longo de toda a região codificante do gene, nos íntrons e no promotor, porém, são comuns nos domínios de ligação de nucleotídeos e no domínio regulador da proteína (ROWTREE e HARRIS, 2003).

De acordo com a funcionalidade da proteína, as mutações do gene *CFTR*, foram organizadas em seis classes (ZIELENSKI e TSUI, 1995; ZIELENSKI, 2000), as quais associam a gravidade de uma mutação em relação ao fenótipo do paciente (LUBAMBA *et al.*, 2012). As mutações pertencentes as classes I, II, III e

VI são consideradas graves e as das classes IV, V moderadas (ZIELENSKI e TSUI, 1995; ZIELENSKI, 2000; LUBAMBA *et al.*, 2012).

As Mutações de classe I e II são responsáveis pela ausência da proteína CFTR na membrana celular. Na classe I não ocorre a síntese da proteína e na classe II, a proteína não é processada adequadamente. As proteínas formadas ficam retidas no retículo sarcoplasmático, não sendo, portanto, encaminhadas ao complexo de Golgi para a finalização da sua glicosilação e consequente maturação, sendo conduzidas ao proteossoma para degradação (ZIELENSKI e TSUI, 1995; ZIELENSKI, 2000; LUBAMBA *et al.*, 2012) (FIGURA 4).

Nas classes III, IV, V e VI a proteína CFTR é processada e posicionada na membrana celular. Na classe III, ocorre incapacidade de ligação do ATP nos domínios de ligação de nucleotídeos, impedindo, desta forma, ativação do cAMP e fosforilação do domínio R pela proteína quinase A, e funcionamento da proteína como um canal de cloro. As mutações de classe IV afetam o transporte de cloro fazendo que este seja diminuído. Na classe V há redução no número de proteínas em decorrência a desregulação da transcrição (ZIELENSKI e TSUI, 1995; ZIELENSKI, 2000; LUBAMBA *et al.*, 2012). As mutações da classe VI são responsáveis pela diminuição da estabilidade da proteína CFTR (ZIELENSKI, 2000; LUBAMBA *et al.*, 2012) (FIGURA 4).

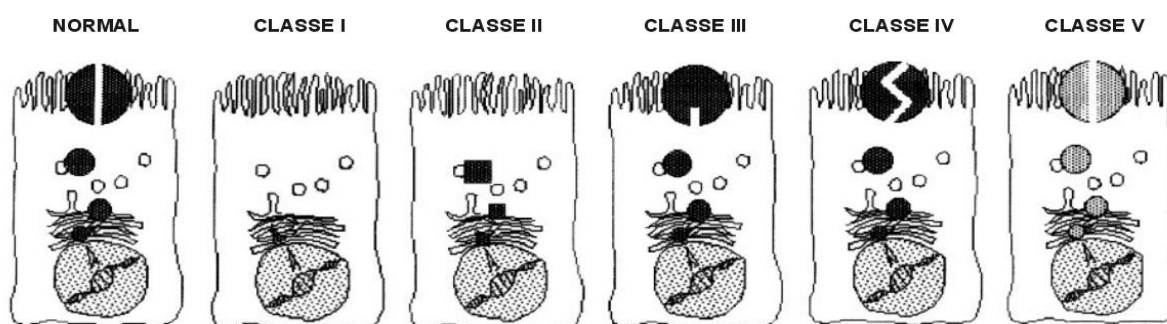


FIGURA 4 - CLASSES DAS MUTAÇÕES DO GENE CFTR E MECANISMO FUNCIONAL DA PROTEÍNA. CLASSES I E II AUSÊNCIA DA PROTEÍNA NA MEMBRANA PLASMÁTICA., CLASSES III, IV, V E VI PRESENÇA DA PROTEÍNA NA MEMBRANA, PORÉM COM ALTERAÇÃO FUNCIONAL.

FONTE: ZIELENSKI e TSUI, 1995.

Desde a identificação do gene *CFTR*, em 1989, quase 2000 mutações já foram descritas, segundo o site *Cystic Fibrosis Mutation Database*, destas, a mutação *p.Phe508del* é a que apresenta a maior frequência mundial (70% dos casos) (KEREM *et al.*, 1989; ROMMENS *et al.*, 1989; RIORDAN *et al.*, 1989, ESTIVILL *et al.*, 1997, BOBADILLA *et al.*, 2002) seguida das mutações *p.Gly542X* (3,2%), *p.Asn1303lys* (2,1%), *p.Gly551aps* (2,9%) e *p.Arg553X* (1,6%) (TSUI, 1992; ESTIVILL *et al.*, 1997, BOBADILLA *et al.*, 2002).

No Brasil, estas mutações representam 56% dos alelos para FC e sua frequência varia de região para região (RASKIN *et al.*, 1999; RASKIN *et al.*, 2003). No Sul do país a frequência dos alelos *p.Phe508del* e *p.Gly542X* estão presentes em 49,1% e 2,8% no Rio Grande do Sul, 55,2% e 6,3% em Santa Catarina, 39% e 9,0% no Paraná respectivamente (RASKIN, 2001).

Além destas mutações, estudos relatam, no Sul do País, a presença da *p.Asn1303lys*, presente em 3,8% no Rio Grande do Sul, 5,2% em Santa Catarina e 5% no Paraná (PEREIRA *et al.*, 1999, RASKIN *et al.*, 2007; RASKIN *et al.*, 2008). A *p.Arg1162X*, com frequência de 3,6% em Santa Catarina e Paraná e a mutação *p.Lys684serfsX38* em 2,7% dos casos de FC (FAUCZ *et al.*, 2007). Em estudo realizado por Pereira *et al.*, (1999), foi encontrada a frequência de 1,02% para as mutações *p.Arg1162X* e *pLys684serfsX38* no Paraná.

3.1.4.1 Mutação *p.Phe508del*

A mutação *p.Phe508del*, de classe II, é caracterizada pela deleção de três pares de bases (CTT) no éxon 10, resultando na ausência do aminoácido fenilalanina na posição 508 da proteína CFTR (ROMMENS *et al.*, 1989; RIORDAN *et al.*, 1989, KEREM *et al.*, 1990, LUBAMBA *et al.*, 2012). Esta deleção da fenilalanina impede a migração da proteína para o ápice da membrana celular, mantendo-a retida no citoplasma celular, no complexo de Golgi e no retículo endoplasmático. A ausência da proteína na membrana celular proporciona um fenótipo grave da doença, marcado por insuficiência pancreática e presença de íleo meconial (KEREM *et al.*, 1990; LUBAMBA *et al.*, 2012).

3.1.4.2 Mutação *p.Gly542X*

Classificada como uma mutação *nonsense* de classe I a *p.Gly542X*, caracteriza-se pela troca de uma guanina (G) por uma timina (T) no nucleotídeo 1756 do éxon 11 do gene *CFTR*, transformando o código de glicina em um código de parada de transcrição no códon 542 (RASKIN, 2001), o que não permite a síntese da proteína CFTR (MISHRA *et al.*, 2005; LUBAMBA *et al.*, 2012) predispondo a insuficiência pancreática grave e doença pulmonar (DU *et al.*, 2008; KRISTIDES *et al.*, 1992).

3.1.4.3 Mutação *p.Asn1303lys*

A mutação *p.Asn1303lys*, classificada como uma mutação *missense*, de classe II, consiste na troca de uma citosina (C) por guanina (G) no nucleotídeo 4041 do éxon 21, levando à substituição de asparagina por lisina no códon 1303 promovendo bloqueio do processamento e consequente não atividade do canal CFTR nas membranas apicais das células epiteliais (RASKIN, 2001).

É considerada uma mutação grave em decorrência da associação com o fenótipo de íleo meconial e insuficiência pancreática, porém, o envolvimento pulmonar ainda não tem correlação comprovada com a mutação *p.Asn1303lys* (OSBORNE *et al.*, 1992).

3.1.4.4 Mutação *p.Arg1162X*

A mutação *p.Arg1162X* classificada como *nonsense*, de classe IV consiste na substituição de uma citosina (C) por uma guanina (G) na posição 3616, no éxon 19, como consequência ocorre substituição de uma arginina na posição 1162 do *CFTR* por um códon de término, o que promoverá termino prematuro na tradução da proteína. Esta mutação também está relacionada à grave insuficiência pancreática e sutil doença pulmonar (GASPARINI *et al.*, 1992).

3.1.4.5 Mutação *p.Lys684serfsX38*

A mutação *p.Lys684serfsX38*, *frameshift*, de classe II é caracterizada pela substituição de uma adenina (A) por uma guanina (G) na posição 2183 e deleção de uma adenina (A) na posição 2184 no éxon 13 está associada à quadro clínico grave com manifestação pulmonar precoce (BOZON *et al.*, 1994).

3.1.5 Relação genótipo fenótipo

Na FC o fenótipo é altamente heterogêneo representado pela variabilidade do comprometimento dos diversos órgãos afetados pela doença (CASTELLANI *et al.*, 2008). Apesar da classificação das mutações fornecerem informações acerca da gravidade da mutação, não podem ser consideradas como o único fator para previsão de prognóstico (CASTELLANI *et al.*, 2008). A grande variabilidade clínica e a presença de heterozigotos compostos dificulta o estabelecimento da correlação entre genótipo e fenótipo (FAUCZ *et al.*, 2007).

Geralmente as mutações consideradas graves (classe I, II, III e VI), relacionam-se com insuficiência pancreática, manifestação respiratória grave, altos níveis de cloro no suor, infertilidade masculina, desnutrição e mortalidade prematura. As mutações moderadas (classe IV e V) são associadas com diagnóstico tardio, níveis mais baixos de cloro no suor, doença pulmonar moderada, suficiência pancreática e expectativa de vida maior (ZIELENSKI, 2000; ROWNTREE e HARRIS, 2003; CASTELANNI *et al.*, 2008).

Combinações entre as mutações de classe I, II, III e VI com as de classe IV e V, caracterizam predomínio fenotípico das mutações de classe IV e V, favorecendo um quadro clínico mais brando (CASTELANNI *et al.*, 2008). Combinações de uma mutação grave com uma moderada, geralmente resultam na ausência congênita bilateral dos vasos deferentes, com sobreposição do quadro respiratório (MOSKOWITZ *et al.*, 2008).

O sistema respiratório é o que apresenta maior variabilidade (CULLING e OGLE, 2010, GRAVINA *et al.*, 2014), ocorrendo baixa relação entre o genótipo e o

comprometimento pulmonar, enquanto o comprometimento pancreático é fortemente associado ao genótipo *CFTR* (CUTTING, 2005).

A heterogeneidade clínica observada na FC é parcialmente explicada pelas mutações descritas no gene *CFTR*. Como esta variação clínica também ocorre entre pacientes com o mesmo genótipo e em membros da mesma família, existe a hipótese de que outros fatores genéticos e/ou ambientais possam estar influenciando nesta heterogeneidade (ROWNTREE e HARRIS, 2003; GRAVINA *et al.*, 2014).

Estudos demonstram que genes envolvidos no processo da inflamação, atuam como modificadores da doença pulmonar na FC (ROWNTREE e HARRIS, 2003). Hull e Thomson (1998) e Coutinho *et al.* (2014) verificaram associação entre gene *tumour necrosis factor α* (*TNF- α*) com a doença pulmonar grave, Arkwright *et al* (2000) encontraram relação entre o gene *transforming growth factor β 1* (*TGF- β 1*) com o rápido declínio da função pulmonar e Garred *et al* (1999) e Rowntree e Harris (2003) também verificaram que variantes alélicas do gene *mannose-binding lectin 2* (*MBL2*) estão relacionadas com a gravidade da doença pulmonar na FC.

3.2 SISTEMA COMPLEMENTO

O sistema complemento faz parte do sistema imune inato e está envolvido no início da imunidade adaptativa, sendo o principal mediador humoral do processo inflamatório (WALPORT, 2001; ABBAS *et al.*, 2007; CHEN *et al.*, 2010).

Em condições fisiológicas contribui para defesa contra infecções bacterianas piogênicas, ponte entre o sistema imune inato e o adaptativo e remoção de complexos imunes e dos produtos da lesão inflamatória (WALPORT, 2001; OKROJ *et al.*, 2007). É constituído por aproximadamente 35 proteínas plasmáticas e de superfície celular, produzidas principalmente no fígado e encontradas no plasma na sua forma inativa (QU *et al.*, 2009).

Para que exerça suas funções na resposta imunológica é necessário que seja ativado e origine fragmentos que irão promover a lise celular, a quimiotaxia das células inflamatórias, o aumento da fagocitose por neutrófilos e macrófagos, a

ativação de células B e T e a remoção de imunocomplexos circulantes e células apoptóticas (ABBAS *et al.*, 2007; QU *et al.*, 2009; SARMA e WARD, 2011).

A ativação do sistema complemento ocorre de forma rápida após estímulo específico e é seguida de uma cascata de auto amplificação (QU *et al.*, 2009). Sua ativação pode ocorrer por meio de três vias: a via clássica, a via da lectina e a via alternativa. A via alternativa e das lectinas são mecanismos efetores da imunidade natural, enquanto a via clássica é um componente fundamental da imunidade humoral adquirida (ABBAS *et al.*, 2007; LOOD *et al.*, 2012).

A via clássica envolve reações sequenciais C1, C4, C2 e C3 e é ativada quando moléculas C1q ligam-se principalmente a imunoglobulinas IgM ou IgG. A via das lectinas é ativada pela ligação da MBL (lectina ligante de manose) ou das ficolinas a resíduos de carboidratos presentes na superfície de microrganismos. A via alternativa é ativada na presença de vários patógenos microbianos, fornecendo uma opção de amplificação para as outras duas vias (FIGURA 5) (JANEWAY JR E TRVERS, 2005; TAKAHASHI *et al.*, 2006; ABBAS *et al.*, 2007; LOOD *et al.*, 2012).

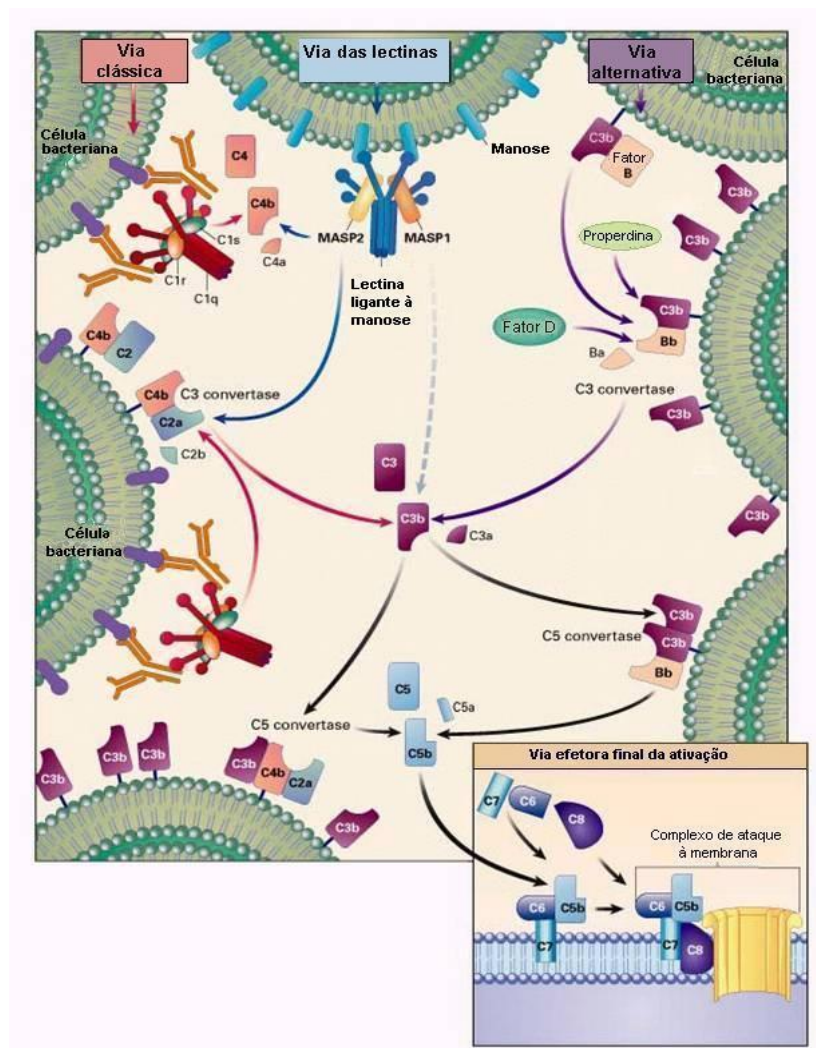


FIGURA 5 - VIAS DE ATIVAÇÃO DO SISTEMA COMPLEMENTO
 FONTE: WALPORT (2001).

Embora as vias de ativação do sistema complemento se diferenciem na forma como são iniciadas, todas resultam na geração de complexos enzimáticos C3 convertase, capazes de clivar a proteína C3 em dois fragmentos, C3a (fragmento menor) e C3b (fragmento maior), responsável pela origem da enzima C5 convertase. Com a formação da C5 convertase ocorre a clivagem da proteína C5 em C5a (mediador da inflamação) e C5b (ABBAS et al., 2007; LOOD et al., 2012).

Os peptídeos ativos C3a e C5a são responsáveis por desencadear efeitos pró inflamatórios como a quimiotaxia de leucócitos, degranulação de mastócitos e basófilos, contração da musculatura lisa e aumento da permeabilidade dos vasos. E o C5b, pela origem do complexo de ataque à membrana (C5b-9) (ABBAS et al., 2007; LOOD et al., 2012).

Após a execução apropriada das suas funções, o sistema complemento cessa suas atividades por meio de mecanismos regulatórios, constituídos por diversas proteínas solúveis associadas a membranas celulares (ABBAS; LICHTMAN; POBER, 2008). Uma ativação excessiva do sistema complemento promove grande risco de lesão para o hospedeiro em consequência a destruição tecidual inflamatória gerada direta ou indiretamente pela sua ativação (FLEMING e TSOKOS, 2006).

3.2.1 Via das lectinas

A via das lectinas independe de anticorpo e sua ativação ocorre quando a MBL liga-se a resíduos de manose e outros açúcares na superfície de patógenos. Esta via também pode ser ativada pela ficolina/p35 (Ficolinas 2 ou L) e pelo antígeno Hakata (Ficolina 3 ou H) (TURNER, 2003).

No plasma, a MBL encontra-se associada às serinas proteases MASP1, MASP2, MASP3 e a proteína inativa Map19/sMAP. Este complexo liga-se aos carboidratos na superfície dos microorganismos e ativa C4 e C2, que levarão a produção da C3 convertase (C4bc2a) e consequentemente a formação do complexo citolítico de ataque à membrana (C5b-9) (FIGURA 6) (ABBAS, 2007).

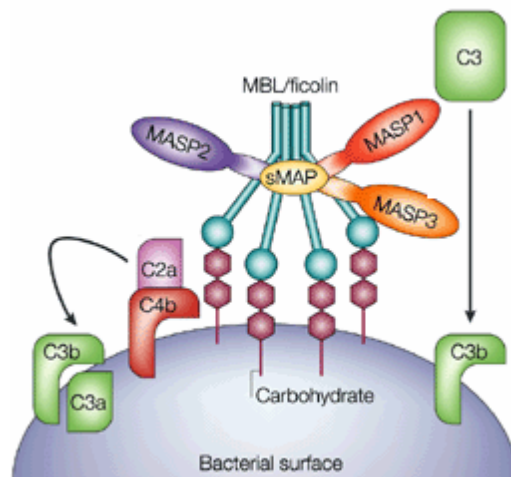


FIGURA 6 – VIA DAS LECTINAS

FONTE: FUJITA (2002).

3.2.1.1 Lectina Ligante de Manose (MBL)

A MBL (lectina ligante de manose) é uma proteína sintetizada no fígado e secretada na corrente sanguínea durante as fases agudas das infecções. Seu nível máximo (adulto) é atingido nas primeiras semanas de vida (TURNER, 1996; MATSUSHITA e FUJITA, 1992; SILVA e MOTA, 2003; LARSEN *et al.*, 2004; CATSBURG *et al.*, 2007; KAMESH *et al.*, 2007). Pertence a família de proteínas dependentes de cálcio, denominadas colectinas (lectinas colagenosas) que apresentam domínios de lectina para reconhecimento de carboidratos e regiões de colágeno (FUJITA, 2002; TURNER, 2003; DOMMETT *et al.*, 2006; Ip *et al.*, 2009).

A MBL faz parte do sistema imune inato e desempenha papel importante na primeira linha de defesa contra microrganismos, sendo a proteína chave na ativação do complemento pela via das lectinas. Sua ligação a microrganismos resulta na ativação da cascata do complemento e consequente formação do complexo lítico de membrana (C5b-9) levando à destruição do patógeno (TURNER, 1996; KAMESH *et al.*, 2007; Ip *et al.*, 2009).

É um dos mais versáteis componentes do sistema imunológico inato, apresentando funções semelhantes a IgM, IgG e C1q (TURNER, 2003).

Além da ativação do sistema complemento, a MBL apresenta como funções a opsonização e ativação da fagocitose, por meio da interação com receptores específicos da superfície das células fagocíticas, modulação da inflamação, pela liberação de citocinas pro inflamatórias (TNF α , IL-1 e IL-6) e remoção de células apoptóticas pelo favorecimento da ligação destas células aos neutrófilos polimorfonucleares (JACK *et al.*, 2001; OGDEN, 2001; BOUWMAN *et al.*, 2006; ; KAMESH *et al.*, 2007; SHARON, 2008; BOLDT *et al.*, 2009; GRAVINA *et al.*, 2014).

3.2.1.2 Estrutura molecular da MBL

A MBL é formada por três subunidades de cadeias polipeptídicas semelhantes de 32KDa. Cada subunidade (monômero) é composta pelo domínio de reconhecimento de carboidrato (CRD), região hidrofóbica (pescoço), região de colágeno e região N-terminal rica em cisteína (JACK *et al.*, 2001; TURNER, 2003; TAKAHASHI *et al.*, 2006) (FIGURA 7).

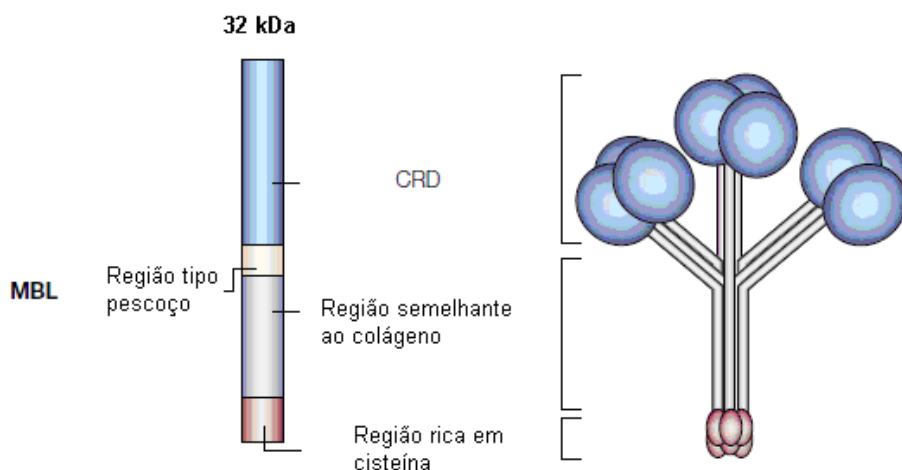


FIGURA 7 – ESTRUTURA MOLECULAR DA MBL
FONTE: FUJITA (2002)

As três cadeias polipeptídicas interagem entre si, através da região de colágeno formando uma tríplice hélice, e interações hidrofóbicas e pontes dissulfeto, entre as regiões N-terminais ricas em cisteína de cada cadeia, promovem a estabilização do trímero (FUJITA, 2002; TURNER, 2003).

A forma circulante da MBL é formada por oligômeros constituídos por duas a seis unidades que formam uma estrutura semelhante a um buquê de tulipas e ao componente C1q do sistema complemento. A forma oligomérica circulante dominante é a hexâmera, podendo, também ser encontrada a presença de dímeros, tetrâmeros e pentâmeros. Para sua completa atividade, é necessário, que a MBL apresente-se, no mínimo na forma oligomérica tetrâmera (JACK *et al.*, 2001; TURNER, 2003 CATSBURG *et al.*, 2007; GARRED, 2008, Ip *et al.*, 2009) (FIGURA 8).

A habilidade de ligação da proteína à microrganismos depende da formação de oligômeros maiores, uma vez que, a oligomerização permite diversas ligações simultâneas (DOMMETT *et al.*, 2006, Ip *et al.*, 2009).

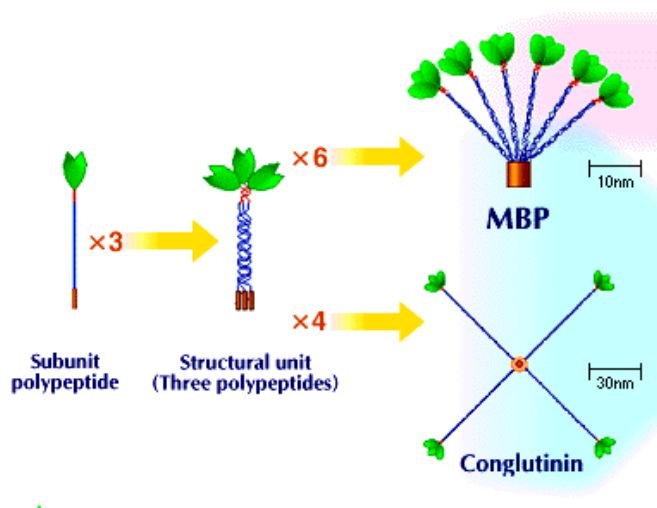


FIGURA 8 – FORMA OLIGOMÉRICA DA MBL

FONTE: ADAPTADO DE FUJITA (2002)

3.2.1.3 Genética Molecular

O gene que codifica a proteína MBL, denomina-se *MBL2* e localiza-se no braço longo do cromossomo 10 (10q11.2-q21). É constituído por quatro éxons e três introns, além do éxon zero entre as regiões promotoras zero e um (TAYLOR *et al.*, 1989; KILPATRICK, 2002; DOMMETT *et al.*, 2006).

Cada éxon codifica um segmento da cadeia proteica. O éxon 1 codifica o domínio N – terminal de 21 aminoácidos e parte da região de colágeno da cadeia. O éxon 2 codifica o restante da região de colágeno, responsável pela ativação do complemento por meio da sua ligação com as MASPs. O éxon 3 codifica uma região intermediária, sítio de reunião das triplas hélices de colágeno. O éxon 4 é responsável pela codificação do domínio de reconhecimento de carboidratos (CRD), no qual a MBL liga-se aos grupos 3-OH e 4 – OH de açúcares da superfície de microrganismos (FIGURA 9) (DOMMETT *et al.*, 2006, Ip *et al.*, 2009).

A concentração sérica da MBL varia entre os indivíduos e é influenciada por mutações de ponto localizadas no éxon 1 do gene *MBL2*, as quais promovem falha na oligomerização das unidades triplas básicas, acarretando diminuição da ativação da via das lectinas do sistema complemento (KILPATRICK, 2002; GARRED *et al.*, 2003; TERAJ *et al.*, 2003; LEE *et al.*, 2005; KAMESH *et al.*, 2007; GARRED, 2008; BOLDT *et al.*, 2009).

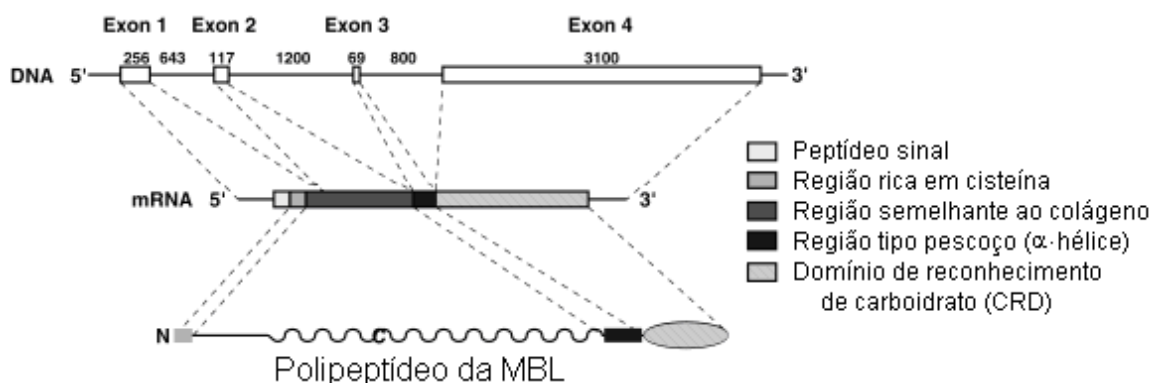


FIGURA 9 – ESTRUTURA DO GENE *MBL2*

FONTE: ADAPTADO DE TURNER (2002)

As três mutações mais comuns do éxon 1 do gene *MBL2* estão localizadas nos códons 52, 54 e 57 e são designadas *D*, *B* e *C* respectivamente. A mutação *D* é caracterizada pela substituição de uma arginina por uma cisteína (CGT para TGT) no códon 52, a mutação *B* pela troca de uma glicina por um ácido aspártico (GGC para GAC) no códon 54 e a mutação *C* pela substituição de uma glicina por um ácido glutâmico (GGA para GAA), no códon 57. O alelo selvagem é denominado de *A* e os alelos variantes em conjunto de *O* (KILPATRICK, 2002; GARRED *et al.*, 2003; TERA *et al.*, 2003; TURNER, 2003, GARRED, 2008; KAMESH *et al.*, 2007; BROUWER *et al.*, 2009).

As mutações na região promotora do gene *MBL2* também acarretam redução na eficiência da MBL. Estas ocorrem nas posições -550, -221 e + 4 e os alelos correspondentes destas regiões são denominados de H/L; X/Y e P/Q (KILPATRICK, 2002, GARRED, 2008). As mutações H/L e X/Y pela substituição de uma guanina por uma citosina, e P/Q pela troca de uma citosina por uma timina (TURNER *et al.*, 2000; CROSDALE *et al.*, 2001; SEYFARTH *et al.*, 2005; ALVES *et al.*, 2007; VALLINOTO *et al.*, 2008; BROUWER *et al.*, 2009).

O genótipo é um bom preditor da concentração sérica da MBL. A concentração sérica média normal em eurodescendentes saudáveis varia de 800 – 1000 ng/mL podendo variar amplamente em virtude das mutações presentes no éxon 1 e/ou no promotor. Os haplótipos *HYA*, *LYA*, *LXA* estão associados com altos, intermediários e baixos níveis séricos de MBL, respectivamente (GARRED, 2008; VALLINOTO *et al.*, 2008).

Os níveis séricos de MBL considerados como deficientes ainda é incerto. Indivíduos homozigotos para o alelo *A* possuem concentrações seis a oito vezes maiores de MBL circulante que indivíduos heterozigotos para o mesmo alelo. Mesmo para indivíduos com o mesmo genótipo ocorre variação da concentração de MBL. Os níveis séricos de MBL podem aumentar de 1,5 a 3 vezes na fase aguda das infecções pela presença de citocinas pró inflamatórias, que estimulam sua secreção (TURNER, 2003; DOMMETT, 2006).

3.3 DOENÇAS ASSOCIADAS À MBL

Estudos mostram que níveis baixos de MBL, na infância, associam – se a infecções graves, aumentando o risco de infecções respiratórias do trato inferior, principalmente entre seis e 18 meses de vida (KOCH *et al.*, 2001). Promovem infecções recorrentes e pneumonias em crianças e adolescentes com Síndrome de Down (NISHIHARA *et al.*, 2010), exercem predisposição para bronquiectasia, fibroses e desenvolvimento de insuficiência respiratória em pacientes com CVID (*common variable immuno deficiency*) (LITZMAN *et al.*, 2008), aumenta o risco de sepse e choque séptico em crianças e adultos (TRINDADE *et al.*, 2008; HUH *et al.*, 2009) e favorece aspergilose pulmonar crônica necrosante (CNPA) (CROSDALE *et al.*, 2001).

Baixas concentrações de MBL também estão relacionadas ao aumento do número de internações hospitalares com exacerbações infecciosas em pacientes com DPOC (YANG *et al.*, 2003) e ao maior risco de desenvolver lúpus eritematoso sistêmico (LEE *et al.*, 2005) e poliartrite na artrite reumatoide juvenil (DOLMAN *et al.*, 2008), além de favorecer a infecção pelo HIV (EISEN e MINCHINTON, 2003).

Em contrapartida, baixas concentrações de MBL podem desempenhar papel de proteção contra parasitas intracelulares, tais como *Plasmodium falciparum* (BOLDT *et al.*, 2009); *M leprae* (DORNELES, *et al.*, 2006; MESSIAS-REASON *et al.*, 2007) e *Leishmania chagasi* (ALONSO, 2007), uma vez que utilizam a MBL ou outros fatores do complemento ativados pela via das lectinas para facilitar sua entrada nas células-alvo. Segundo Miranda *et al.* (2009), baixos níveis de MBL no soro representam fator de proteção em casos de leptospirose devido à baixa produção de componentes inflamatórios, enquanto altas concentrações estão associadas a hemorragias, alterações cardíacas, respiratórias e complicações renais.

Em determinadas situações, níveis altos de MBL podem ocasionar danos teciduais. Na febre reumática, genótipos que determinam valores elevados de MBL aumentam o risco de cardite aguda e crônica (SCHAFRANSKI *et al.*, 2004; SCHAFRANSKI *et al.*, 2008). A presença de alelos selvagens no códon 54 é um dos fatores que aumentam a susceptibilidade à síndrome de Sjögren (WANG *et al.*, 2001). E pacientes com artrite reumatóide com altas concentrações de MBL

podem apresentar maiores danos articulares e distúrbios circulatórios (JACOBSEN *et al.*, 2009).

Segundo Dolman *et al.* (2008), em pacientes que já desenvolveram oligoartrite na artrite reumatóide infantil, baixas concentrações de MBL estão associadas a melhores índices remissivos da doença.

Altos níveis de MBL estão associados a problemas vasculares e com o desenvolvimento de nefropatias em pacientes com Diabetes tipo I (HICKLING *et al.*, 2004; HANSEN *et al.*, 2004; BOUWMAN *et al.*, 2005). E de acordo com Luz (2008), altas concentrações de MBL estão associadas com a gravidade do acometimento cardíaco na doença de Chagas.

Outros autores demonstraram que altos níveis de MBL também podem desempenhar papel de proteção como em casos de alergia e asma (KAUR *et al.*, 2006), meningite bacteriana (VARDAR *et al.*, 2007) e infecções entérica (WANG *et al.*, 2007).

3.3.1 MBL e fibrose cística

Na fibrose cística, estudos relatam que baixos níveis séricos da MBL estão relacionados com a função pulmonar diminuída, aquisição precoce de *Pseudomonas aeruginosa* e *Burkholderia cepacia* e outras bactérias oportunistas, redução da função pulmonar em pacientes adultos e a aumento da taxa de morte ou necessidade de transplantes pulmonar (GARRED *et al.*, 1999; DAVIES *et al.*, 2000; GOMI *et al.*, 2004; YARDEN *et al.*, 2004; DORFMAN *et al.*, 2008; ACCURSO e SONTAG, 2008; TRINDADE *et al.*, 2008, CHALMERS *et al.*, 2011; GRAVINA *et al.*, 2014).

Davies *et al.* (2000) relatam que a concentração da MBL além de influenciar na colonização precoce por *Pseudomonas aeruginosa* e *Burkholderia cepacia*, desempenha importante papel no combate inicial a outras infecções como *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella sp.* e *Escherichia coli* em pacientes fibrocísticos. Muhlebach *et al.* (2006), observaram que o mau prognóstico de fibrocísticos em função dos níveis da MBL está relacionada com o avanço da

idade. Ao contrário Faria *et al.* (2009) não encontraram associação entre as mutações do gene MBL2 e a gravidade do quadro pulmonar em fibrocísticos. E Carlsson *et al.* (2004) verificaram que a colonização por *Pseudomonas aeruginosa* é mais comum em pacientes fibrocísticos com concentrações suficientes de MBL do que em insuficientes. Níveis insuficientes relacionam-se com *Staphylococcus aureus* e função pulmonar reduzida.

4 MÉTODOS

4.1 TIPO DO ESTUDO

Estudo transversal aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná sob o parecer: 2079.246/2009-11 (ANEXO 1).

4.2 LOCAL

O estudo foi realizado no Serviço de Medicina Respiratória Pediátrica do Hospital de Clínicas da UFPR (HC-UFPR) e Laboratórios de Análises Clínicas e de Genética e Biologia Molecular das Faculdades Integradas do Brasil (UNIBRASIL) na cidade de Curitiba – PR.

4.3 POPULAÇÃO E AMOSTRA

Fizeram parte deste estudo 51 crianças com diagnóstico confirmado de Fibrose Cística (FC), triadas ao nascimento e acompanhadas pelo Serviço de Medicina Respiratória Pediátrica do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (HC - UFPR).

4.3.1 Critérios de inclusão

Crianças com diagnóstico confirmado de FC por meio de dois testes do suor, ambos os gêneros, eurodescendentes, identificadas pelo Programa de Triagem Neonatal do Estado do Paraná implementado em 2001 e que estivessem em acompanhamento pelo Serviço de Medicina Respiratória Pediátrica do HC-UFPR no período entre fevereiro de 2010 e janeiro de 2011.

4.3.2 Critérios de exclusão

Não comparecimento ao local da coleta no período do estudo, não amplificação do DNA (Ácido Desoxirribonucleico), amostra sanguínea insuficiente e crianças que não apresentassem o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (APÊNDICE 1) assinado pelos pais e/ou responsável. Em casos de irmãos, um deles foi excluído por meio de sorteio.

4.3.3 Grupo controle para análise da concentração sérica da MBL

Com intuito de verificar a influência da MBL no quadro clínico pulmonar e na microbiota do escarro foram coletadas amostras sanguíneas de 51 crianças saudáveis sem histórico de infecções recorrentes e ou doenças autoimunes, rastreadas para estudo prévio, realizado por Nisihara *et al.*, (2010). Os controles foram aproximados em relação ao gênero, idade e origem étnica com o grupo do estudo e foram recrutadas em uma Unidade de Saúde da Prefeitura Municipal de Curitiba – Pr.

4.4 DELINEAMENTO

4.4.1 Coleta de sangue

As crianças, selecionadas de acordo com os critérios de inclusão e exclusão do estudo, foram encaminhadas ao Laboratório de Análises Clínicas do HC-UFPR e submetidas à coleta de 5 mL de amostra sanguínea venosa de acordo com as normas do laboratório.

4.4.2 Extração de DNA

As amostras sanguíneas foram levadas ao Laboratório de Genética e Biologia Molecular das Faculdades Integradas do Brasil (UNIBRASIL) para a extração do DNA. A extração do DNA foi realizada por meio da técnica adaptada

de Nonidet P - 40 de John *et al.* (1990) modificada por Lahiri e Nurnberger Jr (1991).

Inicialmente as amostras sanguíneas foram centrifugadas a 3000 rpm por 15 minutos e separada a camada de concentrado de leucócitos (*buffy-coat*), a qual foi transferida para um tubo de 15 mL de polipropileno e acrescentado 100 μ L de igepal (Nonidet P - 40) e completado para 8 mL com solução TKM1 (QUADRO 1).

Para obter a homogeneização do detergente foi realizada a agitação da mistura no agitador de tubos e em seguida a centrifugação a 3000 rpm por 10 minutos. Após a centrifugação o sobrenadante foi desprezado e mantido o precipitado, o tubo foi completado para 14 mL de volume com solução TKM1, suspenso o precipitado, agitado no agitador de tubos e centrifugado a 3000 rpm por 10 minutos. Ao obter um precipitado esbranquiçado (limpo) foi desprezado o sobrenadante e acrescentado 800 μ L de solução TKM2 (QUADRO 2), o precipitado foi ressuspensão com micropipeta e passado para um microtubo de 1,5 mL, adicionado 50 μ L de SDS a 10% e incubado em banho-maria a 55°C por 8 a 12 horas.

Ao retirar do banho maria, foi adicionado 300 μ L de NaCl saturado (6M), misturado por inversão e centrifugado a 12000 rpm por 10 minutos. Delicadamente o sobrenadante foi transferido para um tubo de ensaio (sobrenadante contendo o DNA - precipitado com as proteínas) e adicionado dois volumes de etanol 100% a -20°C. O tubo de ensaio foi invertido várias vezes, até o DNA precipitar. O DNA foi retirado do tubo de ensaio com ponteira de micropipeta (ponta cortada), lavado com etanol 70% a 4°C, centrifugado por 10 minutos a 12000 rpm, descartado o sobrenadante e mantido em temperatura ambiente para a secagem. O DNA foi ressuspensionado em aproximadamente 100 μ L de TE e incubado em banho maria em torno de 24 a 48 horas.

TKM1		
REAGENTES	CONCENTRAÇÃO	VOLUME
Tris-HCl pH 7.6	1,0 M	5 mL
KCl	1,0 M	5 mL
MgCl ₂	1,0 M	5 mL
EDTA	0,1M	10 mL
H ₂ O bidestilada até completar o volume de 500 mL		
TKM2		
REAGENTES	CONCENTRAÇÃO	VOLUME
Tris HCl pH 7.6	1,0 M	0,5 mL
KCl	1,0 M	0,5 mL
MgCl ₂	1, 0 M	0,5 mL
EDTA	0,1 M	1,0 mL
NaCl	1,0 M	20,0 mL

QUADRO 2 – SOLUÇÕES UTILIZADAS PARA EXTRAÇÃO DE DNA (MERCK, USA)
 FONTE: RASKIN (2001).

As amostras de DNA tiveram sua concentração determinada por espectrofotometria e em seguida armazenadas a – 20°C.

4.4.3 Genotipagem dos alelos do gene *CFTR*

4.4.3.1 Reação em cadeia da polimerase com sequência específica de primer (PCR)

A genotipagem das mutações *p.Phe508del*, *p.Gly542X*, *p.Asn1303lys*, *p.Arg1162X* e *p.Lys684serfsX38*, do gene *CFTR* foi realizada por meio da técnica de PCR (reação em cadeia da polimerase) no Laboratório de Genética e Biologia Molecular das Faculdades Integradas do Brasil (UNIBRASIL).

As reações foram realizadas com volume final de 25 µL, contendo 50 ng de DNA, 20 pmol de cada primer iniciador específico (QUADRO 3), 0,5 U de *Taq Polimerase* (INVITROGEN, Waltham, Massachusetts, USA) e quantidade necessária de supermix (INVITROGEN, Waltham, Massachusetts, USA) para completar o volume final.

MUTAÇÃO	INICIADOR
<i>p.Phe508del</i>	5'- GTTTTCCTGGATTATGCCTGGCAC-3' 5'- GTTGGCATGCTTTGATGACGCTTC-3'
<i>Gly542X</i>	5'- CAGAGAAAGACAATATAGTTCC-3' 5'- AAATGCTTGCTAGACCAAT-3'
<i>p.Asn1303lys</i>	5'- CCACTGTTCATAGGGATCCAG-3' 5'-AGAAAGTATTTATTTTTCTGGAAC-3'
<i>p.Lys684serfsX38</i>	5'- CATGGGATGTGATTCTTTCGA-3' 5'- CTCTCCAGTCTGTTTAAAAGATAG-3'
<i>p.Arg1162X</i>	5'- CCGACAAATAACCAAGTGAC-3' 5'- CTGTGGCCAGGACTTATTGA-3'

QUADRO 3 - INICIADORES UTILIZADOS NAS REAÇÕES PCR PARA ANÁLISE DAS MUTAÇÕES

FONTE: KEREM *et al.* (1989); NG *et al.* (1991); PEREIRA (1996).

As reações de PCR foram submetidas a um programa de amplificação específico (QUADRO 4) em termociclador (Biocycler ®).

ETAPAS	<i>p.Phe508del</i>	<i>p.GlyG542X</i>	<i>p.Asn1303lys</i>	<i>p.Lys684serfsx38</i>	<i>p.Arg1162X</i>
(Passo 1) Desnaturação	96 °C 5min	96 °C 5min	95 °C 3min	96 °C 5min	96 °C 5min
(Passo 2) 35 ciclos Desnaturação Hibridação Extensão	94 °C: 60 s 64 °C: 45 s 72 °C: 60 s	94 °C 55 °C 72 °C	95 °C: 30 s 52 °C: 30 s 72 °C: 60 s	94 °C: 30 s 52 °C: 30 s 72 °C: 30 s	94 °C: 30 s 55 °C: 30 s 72 °C: 20 s
(Passo 3) Extensão	72 °C 10 min	72 °C	72 °C 5 min	72 °C 3min	72 °C 10 min
(Passo 4) Armazenament o	4 °C	4 °C	4 °C	4 °C	4 °C

QUADRO 4 – PROGRAMA DE PCR PARA O GENE *CFTR*FONTE: SAIKI *et al.* (1986), PEREIRA (1996)

Para a detecção da ocorrência ou não de amplificação, 5µL do produto de PCR adicionado de 3µL de corante azul de bromofenol foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 2%. A corrida eletroforética foi realizada em voltagem de 250 v por aproximadamente 3 horas e utilizado como tampão de corrida TBE 1X.

As amostras amplificadas foram submetidas a uma nova eletroforese em gel de poliacrilamida (12%) ou agarose (2%) de acordo com o tamanho do fragmento. O produto de PCR referente as mutações *p.Gly542X*, *p.Asn1303lys*, *p.Lys684serfsX38* e *p.Arg1162X* foram submetidos à digestão com enzima de restrição antes desta nova eletroforese.

Foram utilizadas as enzimas *BstnI* (BIOLABS, Ipswich, Massachusetts, USA) para a mutação *p.Gly542X* e *p.Asn1303lys*, *DdeI* (SIGMA, Saint Louis, USA) para *p.Arg1162X* e a *AluI* (INVITROGEN, Waltham, Massachusetts, USA) para a

mutação *p.Lys684serfsX38*. As reações foram incubadas em banho maria a 37°C por 2 horas para a enzima *Ddel* e *AluI* e a 60 °C para *BstnI*.

4.4.3.2 Eletroforese em gel de agarose

Para análise dos genótipos *p.Arg1162X* e *p.Lys684serfsX38* do gene *CFTR* foi realizada eletroforese por 4 horas em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio e visualizado em transiluminador UV.

Para a mutação *p.Arg1162X* o fragmento amplificado apresenta 370 pb. A enzima *Ddel* detecta um sítio de restrição criado pela mutação, além de um sítio constante para todos os fragmentos de 95 pb que serve como controle interno da atividade da enzima, indivíduos sem a mutação apresentam duas bandas (95 pb e 275 pb), os heterozigotos para a mutação quatro bandas (95 pb, 275 pb, 143 pb e 132 pb) e os homozigotos três bandas (95 pb, 143 pb e 132pb) (PEREIRA, 1996) (FIGURA 10).

pb	AA	Aa	aa
370			
275	■	■	
143		■	■
132		■	■
95	■	■	■

FIGURA 10 – PADRÃO ESPERADO DE ELETROFORESE PARA A MUTAÇÃO *p.Arg1162X* DO GEN *CFTR* APÓS DIGESTÃO ENZIMÁTICA

AA – HOMOZIGOTO NORMAL PARA A MUTAÇÃO; Aa - HETEROZIGOTO COMPOSTO; aa – HOMOZIGOTO PARA A MUTAÇÃO

FONTE: O autor (2014)

O fragmento para a mutação *p.Lys684serfsX38* apresenta 145 pb de comprimento, como esta mutação cria um sitio de restrição para a enzima AluI, o fragmento dos indivíduos normais apresenta uma banda (145 pb), os homozigotos para a mutação duas bandas (121 e 24 pb) e os heterozigotos três bandas (24, 121 e 145 pb) (PEREIRA, 1996) (FIGURA 11).

pb	AA	Aa	aa
145	■	■	
121		■	■
24		■	■

FIGURA 11 – PADRÃO ESPERADO DE ELETROFORESE PARA A MUTAÇÃO DO GENE *p.Lys684serfsxX38* CFTR APÓS DIGESTÃO ENZIMÁTICA

AA – HOMOZIGOTO NORMAL PARA A MUTAÇÃO; Aa - HETEROZIGOTO COMPOSTO; aa – HOMOZIGOTO PARA A MUTAÇÃO

FONTE: O autor (2014)

4.4.3.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida

A análise dos genótipos *p. p.Phe508del*, *p.Asn1303lys* e *Gly542X* foi realizada por meio da eletroforese em gel de poliacrilamida a 12% de 14 e 6 horas respectivamente em temperatura ambiente.

Após a eletroforese o gel para análise da mutação *p.Phe508del* foi corado com nitrato de prata de acordo com a técnica descrita por Sanguinetti (1994) e o gel para a mutações *p.Asn1303lyse* *p.Gly542X* corados com brometo de etídio e visualizados através de luz ultravioleta (UV).

O fragmento amplificado para a *p.Phe508del* apresenta 98pb de comprimento. Indivíduos que apresentam a mutação para *p.Phe508del*, possuem

deleção de três pares de base, portanto, indivíduos normais para a mutação apresentam uma banda de 98pb, homozigotos para a mutação uma banda de 95 pb, e os heterozigotos duas bandas a de 98 pb e 95 pb (RASKIN,2001) (FIGURA 12).

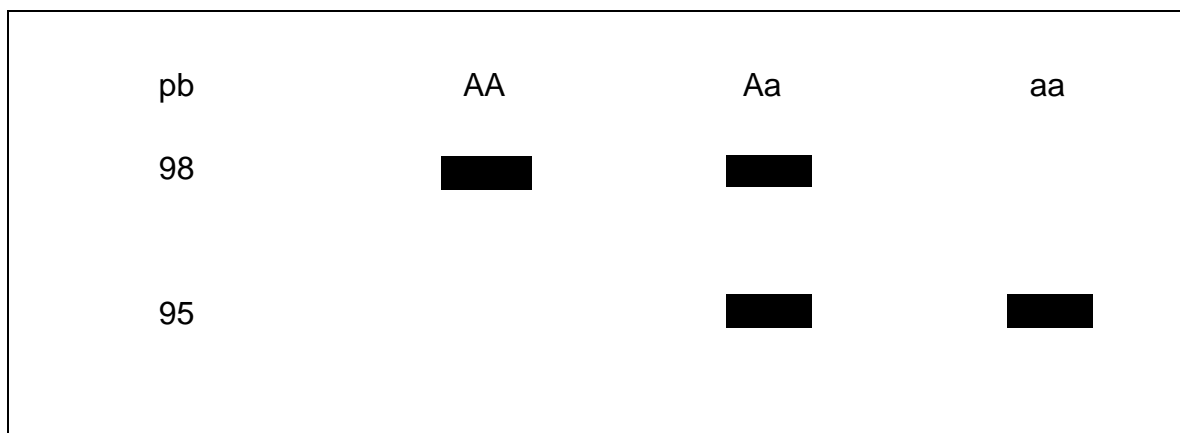


FIGURA 12 – PADRÃO ESPERADO DE ELETROFORESE PARA A MUTAÇÃO *p.Phe508del*

AA – HOMOZIGOTO NORMAL PARA A MUTAÇÃO; Aa - HETEROZIGOTO COMPOSTO; aa – HOMOZIGOTO PARA A MUTAÇÃO

FONTE: O autor (2014)

O fragmento amplificado para *p.Asn13003lys* apresenta 60 pb de comprimento, como esta mutação elimina o sítio de restrição para a enzima Bstnl, o produto de PCR dos indivíduos afetados não sofrem clivagem, resultando em uma única banda de 60pb para os homozigotos, três bandas (60pb, 40pb e 20pb) para os heterozigotos e duas bandas (20pb e 40pb) para os não comprometidos (NG *et al.*, 1991) (FIGURA 13).

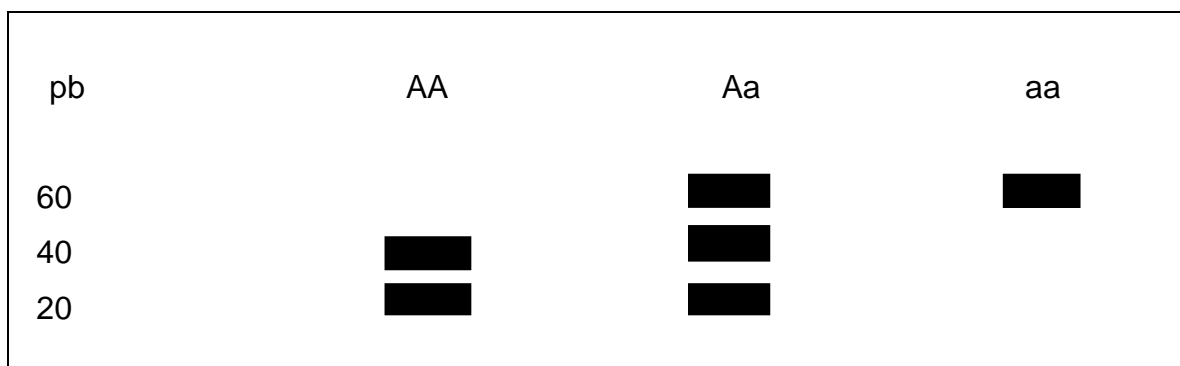


FIGURA 13 – PADRÃO ESPERADO DE ELETROFORESE PARA A MUTAÇÃO *p.Asn1303lys* DO GENE CFTR APÓS DIGESTÃO ENZIMÁTICA

AA – HOMOZIGOTO NORMAL PARA A MUTAÇÃO; Aa - HETEROZIGOTO COMPOSTO; aa – HOMOZIGOTO PARA A MUTAÇÃO

FONTE: O autor (2014)

O fragmento amplificado para *p.Gly542X* apresenta 114pb de comprimento, como esta mutação elimina o sítio de restrição para a enzima Bstnl, o produto de PCR dos indivíduos afetados não sofre clivagem, resultando em uma única banda de 114pb para os homozigotos para a mutação, três bandas (114pb, 90pb e 24pb) para os heterozigotos e duas bandas (24pb e 90pb) para os não comprometidos (NG *et al.*, 1991) (FIGURA 14).

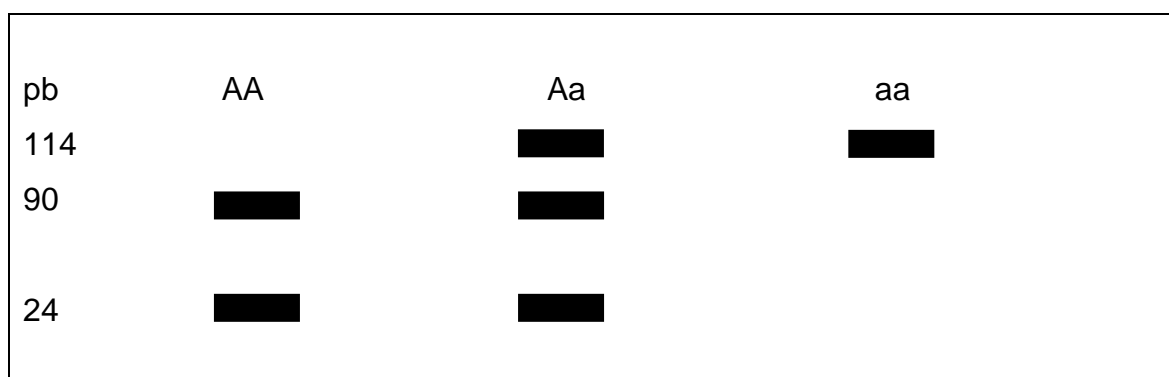


FIGURA 14 – PADRÃO ESPERADO DE ELETROFORESE PARA A MUTAÇÃO *p.GLY542* DO GENE CFTR APÓS DIGESTÃO ENZIMÁTICA.

AA – HOMOZIGOTOS NORMAL PARA A MUTAÇÃO; Aa - HETEROZIGOTO COMPOSTO; aa – HOMOZIGOTO PARA A MUTAÇÃO

FONTE: O autor (2014)

4.4.4 Análise das manifestações clínicas respiratórias

Os dados referentes às manifestações clínicas respiratórias foram obtidas por meio da análise dos prontuários médicos no período entre fevereiro de 2010 e janeiro de 2011.

Considerou-se como manifestações respiratórias tosse seca, tosse produtiva, sinais de esforço respiratório (dispneia e tiragem), baqueteamento, infecções respiratórias de vias aéreas superiores (otite, tonsilite, rinofaringite e /ou sinusites) e inferiores (pneumonia).

4.4.5 Análise da microbiota do escarro

Para avaliação da microbiota foi realizada análise dos exames bacteriológicos de escarro realizados na rotina clínica no período de fevereiro de 2010 e janeiro de 2011 e registrados no sistema informatizado do HC-UFPR.

4.4.6 Obtenção do peso, altura e índice de massa corpórea (IMC)

Os valores do peso e altura foram obtidos por meio da análise dos prontuários, considerando-se os registros da nutrição no dia da coleta da amostra sanguínea para análise de DNA.

Para o cálculo do IMC foi utilizada a equação $IMC = peso / estatura^2$.

O peso, a estatura e o IMC foram avaliados por meio de escores em relação a valores de referência para crianças saudáveis do mesmo sexo e da mesma faixa etária (Escore-Z) conforme preconizado pela Organização Mundial da Saúde (2006) (QUADRO 5).

PESO PARA IDADE	ESTATURA PARA IDADE	IMC PARA IDADE
Muito baixo peso < escore - z - 3	Baixa estatura < escore - z - 2	Baixo IMC < escore - z - 2
Baixo peso ≥ escore - z - 3 e < escore - z - 2		IMC adequado ≥ escore - z - 2 e < escore - z + 1
Eutrófico ≥ escore - z - 2 e < escore - z + 2	Estatura adequada ≥ escore - z - 2	Sobrepeso ≥ escore - z + 1 e < escore - z + 2
Peso elevado ≥ escore - z + 2		Obesidade ≥ - z + 2

QUADRO 5 – VALORES DE REFERÊNCIA DAS VARIÁVEIS PESO, IDADE E IMC EM RELAÇÃO A IDADE PARA CRIANÇAS

FONTE: OMS, 2006

4.4.7 Quantificação sérica de MBL dos pacientes e controles

Foi realizada através de ensaio imunoenzimático (ELISA – *enzyme-linked immunosorbent assay*) utilizando kit comercial (Hycult biotech, Holanda). Todos os reagentes utilizados foram fornecidos pelo fabricante e a quantificação foi realizada de acordo com o protocolo proposto pelo mesmo.

Inicialmente cada poço da microplaca a ser utilizada foi preenchido com 150 µL de tampão de ativação e incubado por 30 minutos a 37 °C. Após o período de incubação, os poços da microplaca foram submetidos a quatro lavagens com 200 µL de tampão de lavagem específico para a retirada do material em excesso.

Terminada a lavagem, foram transferidos 100 µL em duplicata dos calibradores com diferentes concentrações de MBL humana (100 ng/mL, 40 ng/mL, 16 ng/mL, 6,4 ng/mL, 2,6 ng/mL, 1,0 ng/mL, 0,4 ng/mL e 0 ng/mL), 100 µL de tampão de diluição sem amostra (branco), 100 µL de controle negativo e positivo e 100 µL dos soros dos pacientes previamente diluídos em 1/100 com tampão de diluição para a microplaca e incubado por 1 hora a 37 °C. Em seguida, quatro

lavagens da microplaca foram novamente realizadas e adicionado em cada poço 100 µL do anticorpo monoclonal biotinilado anti MBL (solução Tracer) e incubado por 1 hora em temperatura ambiente.

Realizaram-se quatro novas lavagens e adicionou-se 100 µL de streptavidin peroxidase para a formação de um complexo com o anticorpo biotinilado ligado a MBL. Manteve-se a reação incubada por uma hora em temperatura ambiente. Lavou – se a microplaca por mais quatro vezes e acrescentou-se o cromógeno tetrametilbenzidina (TMB), o qual gera um produto de cor azul. Após 30 minutos em temperatura ambiente, foi adicionado 100 µL de solução de bloqueio de reação, a qual pela alteração da coloração para amarelo indicou bloqueio da reação.

Terminado o processo, a leitura das reações foi realizada em um leitor ELISA a 450 nm (Thermo Plate – TP reader basic) e a partir da densidade óptica dos calibradores, determinou-se o fator multiplicador para o cálculo dos valores séricos de MBL, onde:

Fator = concentração de MBL dos calibradores (ng/mL) / D.O dos calibradores

MBL (ng/mL) = Fator X D.O da amostra x diluição da amostra

Foram considerados como valores altos aqueles acima de 1000ng/mL, valores médios aqueles entre 100 e 1000 ng/mL e deficientes os valores abaixo de 100 ng/mL.

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Inicialmente as variáveis analisadas foram avaliadas quanto ao padrão de normalidade por meio do teste de Shapiro - Wilk e em relação à homogeneidade de variâncias por meio do teste F (duas amostras) e de Levéne (mais de duas amostras).

As frequências alélicas das cinco mutações do gene *CFTR* avaliadas, foram combinadas nos alelos I e II. Em seguida as frequências de cada uma das mutações foram somadas entre os dois alelos e comparados com frequências

relativas obtidas na literatura específica da área, por meio do teste de Qui Quadrado. A significância de cada uma das mutações foi posteriormente analisada pelo teste de resíduos ajustados.

Os alelos do gene *CFTR* foram agrupados em genótipos homozigotos e heterozigotos e relacionados com a microbiota do escarro e com as concentrações séricas da MBL por meio do teste de Kruskal – Wallis. E pelo teste de Qui - Quadrado para K proporções com as infecções de vias aéreas superiores (IVAS) e inferiores. Para avaliar o predomínio das bactérias identificadas foi utilizado o teste de Qui - Quadrado para K proporções.

Para avaliar as concentrações séricas da MBL entre o grupo controle e o grupo de crianças com fibrose cística foi utilizado o teste não paramétrico de Mann-Whitney-U, e a relação entre MBL e as infecções de vias aéreas superiores e inferiores, assim como a microbiota do escarro foi utilizado o teste Kruskal – Wallis. A comparação da distribuição dos indivíduos em relação aos níveis baixo, médio e alto de MBL foi realizada por meio do teste exato de Fischer.

O nível de significância considerado para os testes utilizados foi $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

Das 94 crianças com diagnóstico confirmado para fibrose cística e acompanhadas pelo Serviço de Medicina Respiratória Pediátrica do HC-UFPR no período entre fevereiro de 2010 e janeiro de 2011, 83 foram triadas ao nascer. Destas, foram selecionadas para o estudo 51 de acordo com os critérios de inclusão/exclusão. As características da amostra do estudo podem ser visualizadas na Tabela 1.

TABELA 1 – CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA DO ESTUDO

VARIÁVEIS	INDIVÍDUOS (N=51)
Gênero	
Feminino	27 (53%)
Masculino	24 (47%)
Média de idade (anos)	4,5 ± 2,5
Feminino	4,5 ± 2,7
Masculino	4,4 ± 2,4
Peso (kg)	18 ± 6,78
Feminino	17,5 ± 7,64
Masculino	18,6 ± 5,66
Estatura (m)	1,05 ± 0,16
Feminino	1,05 ± 0,18
Masculino	1,05 ± 0,14
IMC (kg/m)	16,28 ± 2,03
Feminino	16,27 ± 2,23
Masculino	16,29 ± 1,79

FONTE: O autor (2014)

Quanto a classificação da amostra em relação ao peso, 39 crianças foram consideradas eutróficas e 10 apresentaram peso elevado. Para a estatura, todas as crianças foram classificadas como adequadas, e ao considerar os valores do IMC para a idade, foram observadas seis crianças com obesidade, 14 com sobrepeso, 31 com IMC adequado e apenas uma com IMC baixo para a idade.

Ao analisar as frequências absolutas e relativas em relação as mutações pesquisadas, observa-se que, dos 102 alelos estudados, 84 (82%) apresentaram uma das mutações, sendo as maiores frequências encontradas para *p.Phe508del* (38,24%) e *p.Gly542X* (26,47%). As mutações *p.Asn1303lys*, *p.Lys684serfsX38* e *p.Arg1162X* foram encontrados em nove (8,82%), cinco (4,9%) e quatro (3,92%) alelos respectivamente. Ao comparar as frequências relativas obtidas para as mutações com as da literatura específica, percebe-se que os genótipos *p.Gly542X* e *p.Asn1303lys* apresentam frequências significativamente elevadas ($p < 0,05$) (TABELA 2).

TABELA 2 – SOMATÓRIO DAS FREQUÊNCIAS ABSOLUTAS E RELATIVAS DAS MUTAÇÕES DO GENE CFTR NO SOMATÓRIO DOS ALELOS I E II, FREQUÊNCIAS RELATIVAS ESPERADAS OBTIDAS NA LITERATURA ESPECÍFICA.

CATEGORIA	FREQUÊNCIA ABSOLUTA	FREQUÊNCIA RELATIVA (%)	FREQUÊNCIA RELATIVA ESPERADA (%) [*]	P-VALOR [*]
<i>p.Phe508del</i>	39	38	39,00 ^{**}	> 0,05
<i>p.Gly542X</i>	27	26	9,00 ^{**}	< 0,05
<i>p.Asn1303lys</i>	9	9	5,00 ^{**}	< 0,05
<i>p.Lys684serfsX38</i>	5	5	1,02 ^{***}	> 0,05
<i>p.Arg1162X</i>	4	4	1,02 ^{***}	> 0,05
Outra mutação	18	18	-	-

^{*} $\chi^2 = P < 0,0001$

^{**} RASKIN (2001) (NÚMERO DE ALELOS OBSERVADOS: 100)

^{***} PEREIRA *et al.*, (1999) (NÚMERO DE ALELOS OBSERVADOS: 98)

FONTE: O autor (2014)

Ao analisar os genótipos determinados para a amostra do estudo, observa-se em relação a heterozigotos compostos, predomínio para a mutação *p.Gly542X* (46%), seguido da *p. Phe508del* (34%). Para as mutações *p.Lys684serfsX38* e *p.Asn1303lys* foram observados 10% e 14% de heterozigotos compostos respectivamente. A mutação *p. Phe508del* apresentou predomínio de homozigotos (22%) e as demais mutações apresentaram variação entre 2 e 4% de homozigotos (TABELA 3).

TABELA 3 – FREQUÊNCIAS ABSOLUTAS E RELATIVAS DO GENE CFTR NA COMBINAÇÃO ENTRE OS ALELOS I E II

GENÓTIPOS <i>CFTR</i>	FREQUÊNCIA ABSOLUTA	FREQUÊNCIA RELATIVA %
<i>p.Phe508del/p.Phe508del</i>	11	22
<i>p.Phe508del /p.Gly542X</i>	8	16
<i>p.Phe508del/ p.Lys684serfsX38</i>	2	4
<i>p.Phe508del / outra mutação</i>	7	14
<i>p.Gly542X/p.Gly542X</i>	2	4
<i>p.Gly542X / p.Lys684serfsX38</i>	2	4
<i>p.Gly542X/ p.Asn1303lys</i>	6	12
<i>p.Gly542X / outra mutação</i>	7	14
<i>p.Arg1162X/ p.Arg1162X</i>	2	4
<i>p.Asn1303lys/ p.Asn1303lys</i>	1	2
<i>p.Asn1303lys / outra mutação</i>	1	2
<i>p.Lys684serfsX38 / outra mutação</i>	1	2
<i>outra mutação/outra mutação</i>	1	2

OUTRA MUTAÇÃO: mutações não identificadas

FONTE: O autor (2014)

Em relação às manifestações respiratórias, foram verificadas, no período entre fevereiro de 2010 e janeiro de 2011, a presença de tosse produtiva, tosse

seca, pneumonia, infecções de vias aéreas superiores (IVAS), dispneia, tiragem e baqueteamento. Destas, a tosse produtiva, a tosse seca e as IVAS foram as que apresentaram maior destaque, com 76%, 37% e 23% respectivamente da amostra do estudo (TABELA 4).

TABELA 4 - MANIFESTAÇÕES RESPIRATÓRIAS DOS PARTICIPANTES DO ESTUDO NO PERÍODO ENTRE FEVEREIRO DE 2010 E JANEIRO DE 2011

VARIÁVEIS	FREQUÊNCIA ABSOLUTA	FREQUÊNCIA RELATIVA (%)
Tosse produtiva	39	76
Tosse seca	19	37
Pneumonia	7	14
IVAS	23	23
Sinais de esforço respiratório		
<i>Dispneia</i>	10	10
<i>Tiragem</i>	7	14
Baqueteamento	6	12
Assintomáticos	4	8

FONTE: O autor (2014)

A microbiota do escarro demonstrou que 46 crianças (90%) apresentaram colonização por bactérias, com média de três culturas positivas/período, com predomínio de *Staphylococcus aureus* (90%), *Haemophilus influenzae* (63%) e *Pseudomonas aeruginosa* (55%) ($p < 0,0001$), não ocorrendo diferença significativa entre elas. *Burkholderia cepacia* e outras bactérias foram encontradas em menores frequências ($p < 0,0001$) (TABELA 5).

TABELA 5 - MICROBIOTA DO ESCARRO REFERENTE AO PERÍODO DE FEVEREIRO DE 2010 E JANEIRO DE 2011

VARIÁVEIS	FREQUÊNCIA ABSOLUTA	FREQUÊNCIA RELATIVA (%)
Contaminação por bactérias	46 (90,2%)	90%
Culturas positivas /ano (média±DP)	3 ±1,86	-
Microbiota do escarro**		
<i>Staphylococcus aureus</i>	41	80%
<i>Haemophilus influenzae</i>	32	63%
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	28	55%
<i>Burkholderia cepacea</i>	8	16%
Outras*	13	25%

* OUTRAS - MRSA, *Myroides odoratos*, *Stenotrophomonas*, *Cryseobacterium sp*

** $\chi^2 = p < 0,0001$

FONTE: O autor (2014)

Ao comparar os diferentes tipos de genótipos encontrados com as IVAS e pneumonia, não foram encontradas diferenças significativas ($p > 0,05$) (TABELA 6).

TABELA 6 – INFECÇÕES RESPIRATÓRIAS (PNEUMONIA E IVAS) EM RELAÇÃO AOS GENÓTIPOS DO GENE *CFTR*

	FREQUENCIA ABSOLUTA	PNEUMONIA*	IVAS*
<i>p.Phe508del/p.Phe508del</i>	11	2 (18%)	2 (18%)
<i>p.Phe508del/p.Gly542X</i>	8	1 (13%)	4 (50%)
<i>p.Phe508del / outra</i>	9	1 (11%)	3 (33%)
<i>p.Gly542X / outra</i>	15	1 (7%)	9 (60%)
<i>outra/ outra</i>	6	1 (17%)	3 (50%)
<i>p.Gly542X / p.Gly542X</i>	2	1 (50%)	2 (100%)

* $\chi^2 = p > 0,05$; OUTRA: *p.Asn1303lys*, *p.Lys684serfsX38*, *p.Arg1162X* e mutações não identificadas, *cBc* : *Burkholderia cepacia*

FONTE: O autor (2014)

Ao relacionar os genótipos do gene *CFTR* com a microbiota do escarro também não foram encontradas diferenças significativas em relação aos genótipos (TABELA 7).

TABELA 7 – MÉDIA E DESVIO PADRÃO REFERENTE A MICROBIOTA DO ESCARRO EM FUNÇÃO DO GENÓTIPO DO GENE *CFTR*

MUTAÇÕES *	<i>S.aureus</i>	<i>P.aeruginosa</i>	<i>H.influenzae</i>	<i>cBc</i>	OUTRAS
<i>p.Phe508del/p.Phe508del</i>	9/11	7/11	7/11	0/11	2/11
<i>p.Phe508del/p.GlyG542X</i>	4/8	1/8	2/8	1/8	0/8
<i>p.Phe508del / outra</i>	7/9	5/9	4/9	0/9	3/9
<i>p.Gly542X / outra</i>	5/15	5/15	6/15	2/15	1/15
<i>outra/outra</i>	2/6	2/6	2/6	1/6	0/6
<i>p.GlyG542X/ p.GlyG542X</i>	2/2	1/2	1/2	0/2	0/2

* KRUSKAL-WALLIS – $p > 0,05$

OUTRA: *p.Asn1303Iys*, *p.Lys684serfsx38*, *p.Arg1162X* e mutações não identificadas

cBc Burkolderia cepacia

FONTE: O autor (2014)

Para a análise da concentração sérica da MBL foram analisados 51 controles e 51 crianças com fibrose cística, e foi possível constatar que não ocorreram diferenças significativas entre o grupo controle e o grupo do estudo em relação aos níveis de concentração de MBL ($p > 0,05$). Também não foram encontradas diferenças significativas em relação a distribuição das crianças e os níveis de concentração de MBL entre o grupo do estudo e controles ($p > 0,05$) (TABELA 8).

TABELA 8 – CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE MBL EM CRIANÇAS COM FIBROSE CÍSTICA E CONTROLES

VALORES DE MBL	CRIANÇAS COM FC **	CONTROLES**
Deficientes (<100 ng/mL)	(23,5%) 12/51	(15,5%) 8/51
Médios (100 – 1000 ng/mL)	(21,5%) 11/51	(23,5%) 12/51
Altos (> 1000 ng/mL)	(55%) 28/51	(61%) 31/51
Mediana	1525	1235*
Variação de MBL	100 a 4050	100 a 5314

* ESTATÍSTICA DO TESTE MANN-WHITNEY: $p > 0,05$

** TESTE EXATO DE FISCHER: $p > 0,05$

A concentração sérica de MBL em relação as infecções de via aérea superior e inferior encontram-se na Tabela 9. Os dados demonstram que não foram encontradas diferenças na concentração sérica da MBL em crianças com e sem IVAS, assim como nas que apresentavam IVAS e pneumonia.

TABELA 9 – CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE MBL EM CRIANÇAS COM FIBROSE CÍSTICA COM E SEM INFECÇÕES DE VIAS AEREAS SUPERIORES (IVAS) E PNEUMONIA (PN)

VALORES DE MBL	CRIANÇAS COM IVAS *	CRIANÇAS SEM IVAS *	CRIANÇAS COM IVAS+ PN *
Deficientes (<100 ng/mL)	(33%) 4/12	(67%) 8/12	(0%) 0/12
Médios (100 – 1000 ng/mL)	(36%) 4/11	(46%) 5/11	(18%) 2/11
Altos (> 1000 ng/mL)	(36%) 10/28	(53%) 15/28	(11%) 3/28
Mediana	1400	1850	1250
Variação de MBL	100 a 3650	100 a 4050	100 a 3800

* KRUSKAL-WALLIS: $p > 0,05$

FONTE: O autor (2014)

Ao verificar os níveis de MBL em relação aos patógenos apresentados pelas crianças com fibrose cística, não foram observadas diferenças significativas entre os níveis baixo, médio e alto e as bactérias *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia* e outras (TABELA 10).

TABELA 10 - CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE MBL EM CRIANÇAS COM FIBROSE CÍSTICA EM RELAÇÃO AOS PATÓGENOS IDENTIFICADOS NA MICROBIOTA DO ESCARRO

VALORES DE MBL	<i>S.aureus</i>	<i>P.aeruginosa</i>	<i>H.influenzae</i>	<i>cBc</i>	OUTRAS
Deficientes (<100 ng/mL)	(83%) 10/12	(58%) 7/12	(58%) 7/12	(17%) 2/12	(17%) 2/12
Médios (100 – 1000 ng/mL)	(73%) 8/11	(45%) 5/11	(73%) 8/11	(18%) 2/11	(27%) 3/11
Altos (> 1000 ng/mL)	(86%) 24/28	(57%) 16/28	(61%) 17/28	(18%) 5/28	(28%) 8/28
Mediana **	1550	1575	1575	2900	2075
Variação de MBL	100 a 4050	100 a 3825	100 a 3800	100 a 4050	100 a 3825

* OUTRAS - *MRSA*, *Myroides odoratos*, *Stenotrophomonas*, *Cryseobacterium sp*

cBc : *Burkholderia cepacia*

** *Kruskal – Wallis*: $p > 0,05$

FONTE: O autor (2014)

Ao analisar a concentração sérica da MBL em relação aos genótipos *p.Phe508del/p.Phe508del*, *Phe508del/p.Gly542X*, *p.Phe508del/outra*, *p.Gly542X/outra*, *outr/outra*, *p.Gly542X / p.Gly542X* do gene *CFTR*, também não foram encontradas diferenças estatísticas ($p > 0,05$) (TABELA 11).

TABELA 11 – CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE MBL EM CRIANÇAS COM FIBROSE CÍSTICA EM RELAÇÃO AOS GENÓTIPOS *CFTR*

MUTAÇÕES *	MBL DEFICIENTE (<100 ng/mL)	MBL MÉDIOS (100 – 1000 ng/mL)	MBL ALTOS (> 1000 ng/mL)
<i>p.Phe508del/p.Phe508del</i>	5/11	2/11	4/11
<i>p.Phe508del /p.Gly542X</i>	2/8	2/8	4/8
<i>p.Phe508del / outra</i>	1/9	3/9	5/9
<i>p.Gly542X / outra</i>	4/15	9/15	2/15
<i>outra/ outra</i>	0/6	2/6	4/6
<i>p.Gly542X / p.Gly542X</i>	0/2	0/2	2/2

OUTRA: *p.Asn1303lys*, *p.Lys684serfsX38*, *p.Arg1162X* e mutações não identificadas

cBc : *Burkholderia cepacia*

* *Kruskal – Wallis*: $p > 0,05$

FONTE: O autor (2014)

6 DISCUSSÃO

Com a análise das cinco mutações do gene *CFTR* (*p.Phe508del*, *p.Gly542X*, *p.Asn1303lys*, *p.Lys684serfsX38* e *p.Arg1162X*) em crianças triadas ao nascimento e com diagnóstico confirmado para fibrose cística (FC) foi possível caracterizar 82,4% os cromossomos analisados.

No Brasil, o primeiro estudo de frequência de mutações com crianças com FC e triadas ao nascimento foi realizado por Perone *et al.*, (2010) que investigaram no estado de Minas Gerais (MG) oito mutações (*p.Phe508del*, *p.Gly542X*, *p.Asn1303lys*, *p.Arg1162X*, *p.Gly85Glu*, *p.Trp1282X*, *711+1G>T* e *3120+1G>A*) em 111 recém nascidos.

No estado do Paraná, até o momento, não foram realizados estudos semelhantes, portanto, o estudo caracteriza-se por ser o primeiro a verificar a frequência das mutações *p.Phe508del*, *p.Gly542X*, *p.Arg1162X*, *p.Asn1303lys* e *p.Lys684serfsX38* em um grupo de crianças paranaenses com diagnóstico confirmado de fibrose cística e triadas ao nascimento.

Os resultados obtidos permitiram constatar que a mutação *p.Phe508del* foi a que apresentou a maior frequência (38,24%) dentre as cinco mutações pesquisadas, corroborando com os estudos de Raskin *et al.*, (2008) que relatam a presença de 39% (39/100 alelos) da mutação *p.Phe508del* no estado do Paraná (PR) e de Faucz *et al.*, (2007) que verificaram 45,54%(51/112 alelos) nos estados do Paraná e Santa Catarina.

Ao comparar a frequência obtida da mutação *p.Phe508del* com outros estados observa-se que a mesma é inferior às relatadas para os estados de Santa Catarina (SC) (55%), Rio Grande do Sul (RS) (49%) e Minas Gerais (MG) (48%) (RASKIN *et al.*, 2008; PERONE *et al.*, 2010). Porém, é superior à verificada por Araújo *et al.*, (2005) no estado do Pará, onde foi estimada em 23%.

Quando comparados os resultados para a mutação *p.Phe508del* com as frequências de países europeus e da América Latina, é possível perceber que os mesmos assemelham-se com os encontrados em Portugal, onde esta mutação é verificada em 45% e diferem das frequências observadas na Espanha (53%), Itália

(51%), Argentina (59%) onde a *p.Phe508del* apresenta valores superiores aos encontrados para a amostra do estudo e da Costa Rica (23%) que apresenta frequência inferior a encontrada (ESTIVILL *et al.*, 1997; BOBADILLA *et al.*, 2002).

A segunda mutação mais frequente identificada no presente estudo foi a *p.Gly542X*, com frequência de 26,47% (27/102 alelos), sendo semelhante com a observada na Costa Rica, onde foi estimada em 25% dos cromossomos analisados (11/44 alelos) (PEREZ *et al.*, 2007). Da mesma forma que o Brasil, a Costa Rica também apresenta forte influência europeia na formação da sua população, o que pode explicar a semelhança.

Entretanto, a frequência da mutação *p.Gly542X*, mostra-se superior à maioria das observadas para as diversas populações, superando significativamente a frequência verificada para o Brasil (5,33%), Europa (2,6%), América Latina (5,08%) e em outros estados do país tais como MG (4,5%), RS (6,3%), SC (10%), Rio de Janeiro (RJ) (2,3%). Não sendo encontrada no estado do Pará, norte do país (ESTIVILL *et al.*, 1997; PEREZ *et al.*, 2007, PERONE *et al.*, 2010; RASKIN *et al.*, 2001; CABELLO *et al.*, 1999, ARAÚJO *et al.*, 2005) ($p < 0,05$).

Quando comparada com estudos de Raskin *et al.*, (2001) e Faucz *et al.*, (2007), realizados com crianças paranaenses, também constata-se que a frequência da mutação *p.Gly542X* do presente estudo é superior. O mesmo ocorre quando comparada com a frequência relatada por Coutinho *et al.* (2013) que observaram a mutação *p.Gly542X* em seis de 70 indivíduos estudados.

As diferenças encontradas podem ser explicadas pelo fato da amostra do estudo ser composta por crianças com diagnóstico confirmado de FC triadas ao nascimento, o que proporcionou que a média do diagnóstico da FC fosse dois meses.

Segundo Santos *et al.* (2005), Sims *et al.* (2005), Souza *et al.* (2006) e Southern *et al.* (2009) por meio do diagnóstico precoce é possível tratar e monitorar adequadamente variáveis como peso, altura e colonizações por patógenos, que influenciam diretamente na sobrevivência de pacientes com FC, otimizando, desta forma, o prognóstico.

Porém, ressalta-se a hipótese de que o diagnóstico da FC quando realizado por meio da história clínica, favorece que pacientes com quadros leves não sejam detectados e pacientes com quadros graves venham a óbito em razão da desnutrição importante e colonização por microorganismos habituais da FC, antes mesmo da realização do diagnóstico da doença e sua genotipagem, o que proporciona que alguns genótipos sejam subdiagnosticados. De acordo com Perone *et al.* (2010) a realização de estudos com amostragens com diagnóstico confirmado para FC e triadas ao nascimento possibilita redução do viés no cálculo da frequência das mutações, quando comparado com a amostragem de pacientes detectados pelo diagnóstico típico.

Outro fator, que pode ter influenciado, é a diferença étnica. No estado do PR os eurodescendentes compreendem 70% da população, os afrodescendentes 3,2 % e a população miscigenada entre euro e afro brasileiros 25%. Nos estados de MG o número de eurodescendentes diminui para 45,38%, e o de afrodescendentes e população miscigenada aumenta para 9% e 44% respectivamente (IBGE, 2010). E no estado do Pará, nota-se que 47% da população apresenta origem europeia, 41% indígena e 12 % são afrodescendentes (ARAÚJO *et al.*, 2005).

As mutações *p.Asn1303lys*, *p.Lys684serfsX38* e *p.Arg1162X*, também foram encontrados na amostra do estudo, com frequência superior a 1%.

A mutação *p.Asn1303lys*, foi a terceira mutação identificada para a população estudada (8,8%). Na Europa é a quarta mutação mais encontrada (1,3%) (ESTIVILL *et al.*, 1999) e a terceira na América Latina (1,65%). No Brasil sua frequência é estimada em 1,83% (34/1858 alelos) (PEREZ *et al.*, 2005).

A frequência observada para a mutação *p.Asn1303lys* é significativamente superior à relatada anteriormente por Raskin (2001) no PR, ocorrendo o mesmo quando é comparada com as frequências obtidas para outros estados. Em São Paulo (SP), Bernardino *et al.* (2000), encontraram frequência de 2,5% em 320 cromossomos, Peroni *et al.* (2010) de 0,9% em 222 cromossomos em MG e Raskin detectou a frequência de 3,8% no RS e 5,2% em SC.

Estudos realizados por Raskin (2001), Fernandes *et al.*, (1994) e Cabello *et al.* (1999) não identificaram este genótipo em Minas Gerais e São Paulo, Rio de Janeiro e em Campinas respectivamente.

Em relação às mutações *p.Arg1162X* e *p.Lys684serfsX38* foram encontradas as frequências de 3,9% e 4,9% respectivamente. Ambas, apresentam frequências superiores as encontradas na Europa, onde a mutação *p.Arg1162X* está presente em 0,51% e a *p.Lys684serfsX38* em 0,36%.

A mutação *p.Lys684serfsX38* foi a quarta mais encontrada para a amostra do estudo, e apesar de mostrar frequência superior quando comparada com estudos realizados por Raskin (2001), Pereira *et al.*, (1999) e Fauz *et al.*, (2007), esta diferença não foi significativa.

A mutação *p.Arg1162X*, foi a que apresentou a menor frequência das cinco mutações pesquisadas, diferenciando-se das frequências encontradas em outros estados tais como MG e SC, onde foi o segundo variante mais encontrado (PERONE *et al.*, 2010; RASKIN *et al.*, 2003).

Em relação às manifestações respiratórias, foi verificado para a amostra do estudo predomínio de tosse produtiva, tosse seca e infecções de vias aéreas superiores (IVAS). Manifestações como pneumonia, sinais de esforço respiratório (dispneia e tiragem) e baqueteamento, foram encontradas em menor proporção. Quatro indivíduos foram identificados como assintomáticos. Diferenciando-se do estudo de Coutinho *et al.* (2013) que encontraram manifestações respiratórias em todos os indivíduos estudados.

Em relação a microbiota do escarro foi identificado o predomínio de *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae* e *Pseudomonas aeruginosa* não ocorrendo prevalência para nenhum destes patógenos. Apesar de a amostra apresentar *Burkholderia cepacia* e outras bactérias, as mesmas, foram encontradas em frequências menores.

Os resultados encontrados corroboram com Lyczak *et al.*, 2002, Oliver *et al.* (2009) e Roman *et al.* (2004) que relatam que os dois patógenos frequentemente presentes no trato respiratório de fibrocísticos são *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*, podendo também ser encontrados *Haemophilus*

influenzae, complexo *Burkholderia cepacia*, *Stenotrophomonas maltophilia* e *Streptococcus pneumoniae*. Segundo Oliver *et al.* (2009) e Roman *et al.* (2004) *Staphylococcus aureus* é o primeiro microrganismo a causar infecções crônicas em pacientes jovens com FC e geralmente está envolvido em exacerbações agudas na primeira infância.

Souza, *et al.* (2006) também encontraram resultados semelhantes em relação a frequência de *Staphylococcus aureus* em uma população de 25 crianças triadas ao nascimento no Paraná.

Ao comparar a frequência obtida neste estudo para *Burkholderia cepacia*, com estudos de Magalhães *et al.* (2004) e Dentini (2010) percebe-se que a mesma mostra-se inferior às descritas pelo autores. Segundo Magalhães *et al.* (2004) *Burkholderia cepacia* está presente em 38,9% de 36 pacientes com fibrose cística, e de acordo com Dentini (2010) em 50 pacientes de 222.

Ao relacionar os genótipos *p.Phe508del*, *p.Gly542X*, *p.Asn1303lys*, *p.Lys684serfsX38* e *p.Arg1162X* com as IVAS, pneumonia e com a microbiota do escarro também não foram encontradas diferenças significativas. Estes resultados assemelham-se aos encontrados por Alvarez *et al.* (2004) que não encontraram relação entre genótipos *CFTR* e *Pseudomonas aeruginosa*, e os de Geborek *et al.* (2010) que não identificaram relação para combinação de mutações de classe I e II com contaminação para a mesma bactéria. Em contrapartida, Oliver *et al.* (2009) relatam que a mutação *p.Phe508del* em homozigose favorece a colonização por *Pseudomonas aeruginosa*.

Na FC indivíduos que apresentam o mesmo genótipo, muitas vezes apresentam características fenotípicas diferentes, o que favorece um quadro variável da doença. Desta forma, acredita-se que outros fatores, poderiam contribuir com o quadro clínico da FC, principalmente em relação as manifestações pulmonares.

Neste estudo avaliou-se a influência da concentração sérica da MBL (lectina ligante de manose) nas infecções de IVAS e inferiores e na microbiota do escarro, além de verificar sua relação com os genótipos *p.Phe508del*, *p.Gly542X*, *p.Asn1303lys*, *p.Lys684serfsX38* e *p.Arg1162X* do gene *CFTR*.

De acordo com Koch et al. (2001) a concentração sérica da MBL é considerada importante para proteção da criança contra microrganismos causadores de infecções respiratórias, principalmente, entre os cinco meses e 18 meses de idade, período no qual a criança perde sua proteção conferida pelos anticorpos maternos e ainda não apresenta capacidade de produzir quantidades suficientes de imunoglobulinas próprias.

Ao analisar os resultados obtidos, foi possível inferir que não ocorreram diferenças significativas dos níveis de MBL em relação as variáveis analisadas e entre controles saudáveis, corroborando com o estudo de Faria et al. (2009) que não encontraram associação entre MBL e a gravidade do quadro pulmonar em fibrocísticos.

Entretanto, estudos realizados por Garred et al., 1999; Davies et al., 2000; Gomi et al., 2004; Yarden et al., 2004; Dorfman et al., 2008; Accurso e Sontag, 2008; Trindade et al., 2008, Chalmers et al., 2011; Gravina et al., 2014, mostram relação entre função pulmonar diminuída, aquisição precoce de *Pseudomonas aeruginosa* e *Burkholderia cepacia* com níveis baixos de MBL.

Os resultados encontrados também diferem-se dos relatados por Carlsson et al. (2004) que verificaram que a colonização por *Pseudomonas aeruginosa*, em fibrocísticos, está relacionada com concentrações suficientes de MBL, e níveis insuficientes relacionam-se com *Staphylococcus aureus*.

Um dos fatores que pode ter influenciado nos resultados é a média de idade da amostra (4,5 anos \pm 2,5). Segundo Muhlebach et al. (2006), o mau prognóstico de fibrocísticos em função dos níveis da MBL está relacionada com o avanço da idade.

Acredita-se também, que pelo fato da amostra do estudo estar em acompanhamento precoce, medidas de tratamento efetivas foram realizadas impedindo que ocorressem comprometimentos respiratórios importantes.

7 CONCLUSÃO

Com a realização deste estudo foi possível verificar que:

- ✓ A mutação *p.Phe508del* apresentou a maior frequência entre as cinco mutações pesquisadas;
- ✓ A frequência observada para a mutação *p.Gly542X* encontrada neste estudo foi significativamente maior de as já descritas na literatura para pacientes brasileiros, reforçando a hipótese de que o diagnóstico da FC quando realizado por meio da história clínica proporciona que alguns genótipos sejam subdiagnosticados, favorecendo que pacientes com quadros graves venham a óbito;
- ✓ A terceira mutação mais encontrada foi a *p.Asn1303lys*, a qual também mostrou diferença estatística ao ser comparada com as frequências encontradas para o estado do Paraná e outros estados do Brasil;
- ✓ As manifestações clínicas respiratórias de maiores proporções encontradas; foram tosse produtiva, tosse seca e infecções de vias aéreas superiores (IVAS);
- ✓ Não foram observadas relações entre as manifestações clínicas pulmonares com os genótipos *p.Phe508del*, *p.Gly542X*, *p.Asn1303lys*, *p.Lys684serfsX38* e *p.Arg1162X* do gene *CFTR*;
- ✓ Não foram encontradas diferenças entre os níveis de MBL entre o grupo de crianças com fibrose cística e controles;
- ✓ Não foram verificadas relações entre a concentração séria de MBL e infecções de vias aéreas superiores e inferiores, com a microbiota do escarro e com os genótipos *p.Phe508del*, *p.Gly542X*, *p.Asn1303lys*, *p.Lys684serfsX38* e *p.Arg1162X* do gene *CFTR*.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. *Imunologia Celular e Molecular*. Rio de Janeiro, 2007.

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; POBER, J. *Imunologia Celular e Molecular*. 4 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.

ACKERMAN, M.J; CLAPHAM, D.E. Ion channels-basic science and clinical disease. *N Engl J Med*, v. 336, n.22, p.1575-1586, 1997.

ACCURSO, F. J.; SONTAG, M. K. Gene Modifiers in Cystic Fibrosis. *J Clin Invest*, v. 118, n. 3, 2008.

AKABAS, M.H. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator: structure and function of na epithelial chloride channel. *J Biol Chem*, v.245, n.6, p.3729-3732, 2000.

ALLONSO, D.P et al. Genotypes of the manan-binding lectin gene and susceptibility to visceral leishmaniasis and clinical complications. *J Infect Dis*, v.195, p.1221-1217, 2007.

ALVES, A. E. M.; COSTA M. R. M. da; LOBATO L.; FERNANDES L. M.; AZEVEDO V. N.; MOREIRA M. R. C.; MACHADO L. F. A.; ISHAK M. O. G.; ISHAK R.; VALLINOTO A. C. R. O Impacto do Polimorfismo no Gene *MBL* (Mannose-Binding Lectin) na Infecção pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (*HIV*). *Revista Científica da UFPA*, v. 4, 2004.

ALVAREZ, A.E.; RIBEIRO, A.F.; HESSEL, G.; BERTUZZO, C.S.; RIBEIRO, J.D. Fibrose Cística em um centro de referência no Brasil: características clínicas e laboratoriais de 104 pacientes e sua associação com o genótipo e a gravidade da doença. *J. Pediatr (Rio J)*, v.5, n. 80, p. 371-379, 2004.

ARAÚJO DE, F.G.; et al. Prevalence of F508, G551D, G542X, and R553X mutations among cystic fibrosis patients in the North of Brazil. *Braz J Med Biol Res*, v.38, n.1, p.11-15, 2005.

ARKWRIGHT, P.D., LAURIE, S., SUPER, M., PRAVICA, V., SCHWARZ, M.J., WEBB, A.K.; HUTCHINSON, I.V. TGF-beta (1) genotype and accelerated decline in lung function of patients with cystic fibrosis. *Thorax*, v. 55, n.6, p. 459-62, 2000.

BERNARDINO, A.L.; FERRI, A.; PASSOS-BUENO, M.R.; KIM, C.E.; NAKAIE, C.M.; GOMES, C.E.; DAMACENO, N.; ZATZ, M. Molecular analysis in Brazilian cystic fibrosis patients reveals five novel mutations. *Genet. Test*, v. 4, n. 1, 2000.

BLACKMAN, S.M *et al.* Relative contribution of genetic and nongenetic modifiers to intestinal obstruction in cystic fibrosis. *Gastroenterology*, n. 131, p.1030-1039, 2006.

BOBADILLA, J.L., MACEK, M., JR., FINE, J.P. E FARRELL, P.M. Cystic fibrosis: a worldwide analysis of CFTR mutations--correlation with incidence data and application to screening. *Hum Mutat*, n.19, p.575-606, 2002.

BOECK, K *et al.* Cystic fibrosis: terminology and diagnostic algorithms. *Thorax*, v.61, p. 627-635, 2006.

BOLDT, A. B. W.; MESSIAS-REASON, I. J.; LELL, B.; ISSIFOU, S.; PEDROSO, M. L. A.; KREMSNER, P. G.; KUN, J. F. J. Haplotype Specific-Sequencing Reveals MBL2 Association with Asymptomatic Plasmodium Falciparum Infection. *Malaria Journal*, v. 8, n. 97, p.1-7, 2009.

BOUWMAN, L. H.; ROEP, B. O.; ROOS, A. Mannose-Binding Lectin: Clinical Implications for Infection, Transplantation, and Auto immunity. *Human Immunology*, v. 67, p. 247–256, 2006.

BOYLE, M.P. Adult cystic fibrosis. *Jama*, v. 298, n.15, p.1787 – 1793, 2007.

BOZON D, ZIELINSKI J, RININSLAND F, TSUI LC. Identification of four mutations in the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator gene: I148T, L1077P, Y1092X, 2183AA>G. *Hum Mut*, v. 3, p. 330-332, 1994.

BROUWER, N *et al.* Mannose-Binding Lectin (MBL) Substitution: Recovery of Opsonic Function In Vivo Lags behind MBL Serum Levels. *J Immunol*, v. 183, n.5, p. 3496-3504, 2009.

BUSH, R. Is topical antifungal therapy effective in the treatment of chronic rhinosinusitis? *J Allergy Clin Immunol*. p. 123-4, 2002.

CABELLO, G.M *et al.* Cystic fibrosis: low frequency of DF508 mutation in 2 population samples from Rio de Janeiro. *Braz Hum Biol*. v. 71, p.189-96, 1999.

CAMARGOS, P.A.M.; GUIMARÃES, M.D.C.; REIS, F.J.C. Prognostic aspects of cystic fibrosis in Brazil. *Ann Trop Paediatr*, v. 20, n. 4, p. 287-91, 2000.

CARLSSON, M.; SJÖHOLM, A. G.; ERIKSSON, L.; THIEL, S.; J. C. JENSENIUS, SEGELMARK, M.; TRUEDSSON, L. Deficiency of the Mannan-Binding Lectin Pathway of Complement and Poor Outcome in Cystic Fibrosis: Bacterial Colonization may be Decisive for a Relationship. *Clinical and Experimental Immunology*, v. 139, p. 306–313, 2004.

CASTELLANI, C. *et al.* Consensus on the use and interpretation of cystic fibrosis mutation analysis in clinical practice. *J Cyst Fibros*, n.7, p.179-96.

CATSBURG, A.; Van der ZWET, W.; MORRÉ, S. A.; OURBURG, S.; VANDENBROUCKE-GRAULS, C. M. J. E.; SABELKOU, P. H. M. Analysis of Multiple Single Nucleotide Polymorphisms (SNP) on DNA Traces from Plasma and Dried Blood Samples. *Journal of Immunological Methods*, v. 321, p. 135–141. 2007.

CHALMERS, J.D.; FLEMING, G.B; HILL, A.T.; Kilpatrick, D.C. Impact of mannose-binding lectin insufficiency on the course of cystic fibrosis: A review and meta-analysis. *Glycobiology*, vol. 21 n. 3, p. 271–282, 2011.

CHEN, M.; DAHA, M. R.; KALLENBERG, C. G. The complement system in systemic autoimmune disease. *J Autoimmun.* v. 34, n. 3, p. J276-286, 2010.

CHMIEL, J.F e DAVIS, P.B. State of the art: why do lungs of patients with cystic fibrosis become infected and why can't they clear the infection? *Respi Res.* v.4, p. 8-20.

CORREIA, S.; NASCIMENTO, C.; PEREIRA, L.; CUNHA, M.V.; CORREIA, I.S.; BARRETO, C. Infecção respiratória por bactérias do *Complexo da Burkholderia Cepacia*: Evolução clínica em doentes com Fibrose Cística. *Rev Port Pneumol*, v. XIV, n. 1, p. 5-26, 2008.

COUTINHO, C.A.; MARSON, F.A.; RIBEIRO, A.F.; RIBEIRO, J.D.; BERTUZZO, C.S. Mutações no gene cystic fibrosis transmembrane conductance regulator em um centro de referencia para fibrose cística. *J. Bras Pneumol*, v.39, p. 555-561, 2013.

COUTINHO, C.A.; MARSON, F.A.; MARCELINO, A.R.; BONADIA, L.C.; CARLIN, M.P.; RIBEIRO, A.F.; RIBEIRO, J.D.; BERTUZZO, C.S. TNF- α polymorphisms as a potential modifier gene in the cystic fibrosis. *J. Epidemiol. Mol. Genet*, v.5, n.2, p. 87-99, 2014.

CROSDALE, D. J.; POULTON, K. V.; OLLIEER, W. E.; THOMSON, W.; DENNING, D. W. Mannose-Binding Lectin Gene Polymorphisms as a Susceptibility Factor for Chronic Necrotizing Pulmonary Aspergillosis. *J Infect Dis*, v. 184, n. 5, p. 653–656, 2001.

CULLING, B. e OGLE, R. Genetic counselling issues in cystic fibrosis. *Pediatric respiratory reviews*, v.11, p.75-9, 2010.

CUTTING, G.R. Modifier genetics: cystic fibrosis. *Annu. Rev. Genomics Hum Genet*, v.6, p.237 -260.

CYSTIC FIBROSIS DATABASE (CFD). Mutation information. Disponível em: <http://www.genet.sickkids.on.ca/app>. Acesso em: 10/06/2014.

CYSTIC FIBROSIS FOUNDATION. Patient Registry 2010 Annual Data Report, Behesda, Maryland, USA.

DALCIN, P.T.; ABREU e SILVA F.A. Cystic fibrosis in adults: diagnostic and therapeutic aspects. J Bras Pneumol, v.34, n.2, p.107 – 117.

DENTINI, P. Complexo da *Burkholderia Cepacia* em pacientes com Fibrose Cística em um centro de Referencia no Brazil: identificação, prevalência e importância clínica, Dissertação de mestrado, 2010. Faculdade de Ciências médicas da Universidade Estadual de Campinas.

DAVIES, J. C.; NETH, O.; ALTON, E.; KLEIN, N. Differential Binding os Mannose-Binding Lectin to Respiratory Pathogens in Cystic Fibrosis. The Lancet, v. 355, Maio, 2000.

DOLMAN, K.M. et al. Mannose-binding lectin deficiency is associated with early onset of polyarticular juvenile rheumatoid arthritis: a cohort study. Arthritis Res Ther., v.10, p.R32, 2008.

DOMMETT RM, KLEIN N, TURNER MW. Mannose-binding lectin in innate immunity: past, present and future. Tissue Antigens, v. 68, n.3, p.193-09, 2006.

DORFMAN, R et al. Complex Two-Gene Modulation of Lung Disease Severity in Children with Cystic Fibrosis. J Clin Invest, v. 118, n. 3, p. 1040- 1049, 2008.

DORNELLES, L. N, PEREIRA-FERRARI L, MESSIAS-REASON, I. J. Mannan-binding lectin plasma levels in leprosy: deficiency confers protection against the lepromatous but not the tuberculoid forms. Clin Exp Immunol, v.145, p.463-8, 2006.

DU, M *et al.* PTC124 is an orally bioavailable compound that promotes suppression of the human CFTR-G542X nonsense allele in a CF mouse model. Medical Sciences, v.105, n.6, p.2064-2069, 2008.

EISEN DP, MINCHINTON RM. Impact of mannose-binding lectin on susceptibility to infectious diseases. Clin Infect Dis, v. 37, p.1496-505, 2003.

ESTIVILL, X.; BANCELLS, C.; RAMOS, C. Geographic distribution and regional origin of 264 cystic fibrosis mutations in European population. The Biomed CF Mutation Analysis Consortium. Hum Mutat. V. 10, p.135-54, 1997.

FARREL, P.M.; ROSENSTEIN, B.T.; WHITE, T.B.; ACCURSO, F.J.; CASTELLANI, C.; CUTTING, G.R., et al. Guidelines for Diagnosis of cystic fibrosis in newborns through older adults: Cystic Fibrosis Foundation Consensus Report. J. Pediatr, v. 153, n. 2, S4-S14, 2008.

FARIA, E. J. de; FARIA, I. C. J. de; RIBEIRO, J. D.; RIBEIRO, A. F.; HESSEL, G.; BERTUZZO, C. S. Associação entre os Polimorfismos dos Genes MBL2, TGF- β 1 e CD14 com a Gravidade da Doença Pulmonar na Fibrose Cística. J bras pneumol, v. 35, n. 4, p. 334-342, 2009.

FAUCZ, F.R.; GIMENEZ, J.; RAMOS, M.D.; FERRARI, L.P.; ESTEVL, X.; RASKIN, S. Cystic Fibrosis in a southern brazilian population: characteristics of 90% of the Alleles. Clin Genet, v.72, p.218-233, 2007.

FUNDAÇÃO ECUMÊNICA DE PROTEÇÃO AO EXCEPCIONAL(FEPE). Estatísticas. Disponível em: <http://www.fepe.org.br/cepe>. Acesso em 10/06/14.

FERNANDES *et al.* Determinação do genótipo de fibrocísticos numa amostra hospitalar do Rio de Janeiro. Ver. Bras. Pat. Clín., v.30, n.4, 1994.

FLEMING, S.D; TSOKOS, G.C. Complement, Natural Antibodies, Autoantibodies and Tissue Injury. Autoimm Reviews. 5:89-92, 2006.

FUJITA, T. Evolution of the Lectin–Complement Pathway and its Role in Innate Immunity. Nature, v. 2, p. 346-353, Maio. 2002.

GARRED, P.; LARSEN, F.; MADSEN, H. O.; KOCH, C. Mannose-Binding Lectin Deficiency –Revised. Mol Immunol v. 40, p. 73-84, 2003.

GARRED, P. Mannose-Binding Lectin Genetics: From A to Z. Biochem, v. 36, n. 6, p. 1461–1466, 2008.

GRAVINA, L.P.; CRESPO, C.; GIUGNO, H.; SEN, L.; CHERTKOFF, L.; MANGANO, A.; CASTAÑOS, C. Mannose-binding lectin gene as a modifier of the cystic fibrosis phenotype in Argentinean pediatric patients. J Cyst Fibros, 2014 (in press).

GARRED, P.; PRESSLER, T.; MADSEN, H.O.; FREDERIKSEN, B.; SVEJGAARD, A.; HOIBY, N.; SCHWARTZ, M.; KOCH, K. Association of mannose-binding lectin gene heterogeneity with severity of lung disease and survival in cystic fibrosis. J. Clin. Invest .v. 104, p.431-437, 1999.

GASPARINI P, BORGO G, MASTELLA G, BONIZZATO A, DOGNINI M, PIGNATTI PF. Nine cystic fibrosis patients homozygous for the CFTR nonsense mutation R1162X have mild or moderate lung disease. J. Med. Genet., 29:558-562, 1992.

GEBOREK, A e HJELTE, L. Association between genotype and pulmonary phenotype in cystic fibrosis patients with severe mutations. J Cyst Fibros, v.10, p.187 -192, 2011.

GOMI, K.; TOKUE, Y.; KOBAYASHI, T.; TAKAHASHI, H.; WATANABE, A.; FUJITA, T.; NUKIWA, T. Mannose-Binding Lectin Gene Polymorphism Is a Modulating Factor in Repeated Respiratory Infections. *Chest*, v. 126, p. 95–99. 2004.

GOSS, C.H.; QUITTNER, A.L. Patient – reported outcomes in cystic fibrosis. *Proc Am Thorac Soc*, v.4, p. 378 – 386, 2007.

GOSS, C.H.; BURNS, J.L. Exacerbation in Cystic Fibrosis: epidemiology and pathogenesis. *Thorax*, v.62, p.360-367, 2007.

HANSEN, T. K.; TARNOW, L.; THIEL, S.; STEFFENSEN, R.; STEHOUWER, C. D.; SCHALKWIJK, C. G.; PARVING, H. H.; FLYVBERG, A. Association Between Mannose-Binding Lectin and Vascular Complications in Type 1 Diabetes. *Diabetes*, v. 53, p. 1570-1576, 2004.

HICKLING, T. P.; CLARK, H.; MALHOTRA, R.; SIM, R. B. Collectins and Their Role in Lung Immunity. *J Leuk Biol*, v. 75, p. 27 33, 2004.

HUH, J.W.; SONG, K.; YUM, J. S.; HONG, S. B.; LIM, C. M.; KOH, Y. Association of Mannose-Binding Lectin-2 Genotype and Serum Levels with Prognosis of Sepsis. *Critical Care*, v. 13, n. 6, 2009.

HUFFMYER, J.L.; LITTLEWOOD, K.E.; Nemergut, E.C. Perioperative management of the adult with cystic fibrosis. *Anesthesia and analgesia*. v. 109, 1949-61, 2009.

IP, W. K. E.; TAKAHASHI, K.; R. EZEKOWITZ, A.; STUART, L.M. Mannose-binding lectin and innate immunity. *Immunol Reviews*, v.230, p.9-21, 2009.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Censo Demográfico 2010. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home>. Acesso em 28/02/2014.

JACK, D.L.; KLEIN, N.L.; TURNER, M.W. Mannose-binding lectin: targeting the microbial world for complement attack and opsonophagocytosis. *Immunological Reviews*, v.180, p.86-99, 2001.

JACOBSEN S, GARRED P, MADSEN HO. Mannose-binding lectin gene polymorphisms are associated with disease activity and physical disability in untreated, anti-cyclic citrullinated peptide-positive patients with early rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*, v.36. p.731-5, 2009.

JANEWAY JR, C. A.; TRAVERS, P.; WALPORT, M.; SHLOMCHIK, M. J. *Imunobiologia: O Sistema Imune na Saúde e na Doença*. 6 ed. Porto Alegre: Artmed, 2007.

JARZABEK, K *et al.* Cystic Fibrosis as a cause of infertility. *Biology*, v.4 n.2, p. 119-129, 2004.

KAMESH, L.; HEWARD, J. M.; WILLIAMS, J. M.; GOUGH, S. C. L.; SAVAGE, C. O. S.; HARPER, L. Mannose-Binding Lectin Gene Polymorphisms in a Cohort Study of ANCA-Associated Small Vessel Vasculitis. *J Rheumatol*, v. 46, p. 1076–1078. 2007.

KOCH, A.; MELBYE, M.; SORESEN, P.; HOMOE, P.; MADSEN, H. O.; MOLBAK, K.; HANSEN, C. H.; ANDERSEN, L. H.; HAHN, G. W.; GARRED, P. Acute Respiratory Tract Infections and Mannose-Binding Lectin Insufficiency During Early Childhood. *J Am Med*, v. 285, p.1316-1321. 2001.

KRISTIDIS, P.; BOZON, D.; COREY, M.; MARKIEWICZ, D.; ROMMENS, J.; TSUI, L.C.; DURIE, P. Genetic determination of pancreatic function in cystic fibrosis. *Am. J. Hum. Genet.*, v. 50, n. 6, p. 1178-1184, 1992.

KAUR, S.; THIEL, S.; SARMA, P. U.; MADAN, T. Mannan-Binding Lectin in Asthma and Allergy. *Current Allergy and Asthma Reports*, v. 6, p. 377–383. 2006.

KEREM, B.S.; ROMMENS, J.M.; BUCHANAN, J.A.; MARKIEWICZ, D.; COX, T.K.; CHAKRAVARTI, A., *et al.* Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science*, v.245, p.1073-1080, 1989.

KILPATRICK, D.C. Mannan-binding lectin: clinical significance and applications. *Biochimica et Biophysica Acta*, v.1572, p.104-413, 2002.

LARSEN, F.; MADSEN, H. O.; SIM, R. B.; KOCH, C.; GARRED, P. Disease-Associated Mutations in Human Mannose-binding Lectin Compromise Oligomerization and Activity of the Final Protein. *J Biol Chem*, v. 279, n. 20, p. 21302–21311, Maio. 2004.

LEE, S. G.; YUM, J. S.; MOON, H.M.; KIM, H. J.; YAHG, Y. J.; KIM, H. L.; YOON, Y.; LEE, S.; SONG, K. Analysis of Mannose Binding Lectin 2 (*MBL2*) Genotype and the Serum Protein Levels in the Korean Population. *Mol Immunol*, v. 42, p. 969-977, 2005.

LI, C e NAREN A.P. Macromolecular complexes of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator and its interacting partners. *Pharmacol.Ther*, v. 108, p.208 - 223, 2005.

LYCZAK, J.B.; CANNON. C.L.; PIER, G.B. Lung infections associated with Cystic Fibrosis. *Clin Microbiol Rev*, v. 15, n. 2, p. 194- 222, 2002.

LITZMAN, J *et al.* Mannose-Binding Lectin Gene Polymorphic Variants Predispose to the Development of Bronchopulmonary Complications but have no Influence on Other Clinical and Laboratory Symptoms or Signs of Common Variable

Immunodeficiency. *Clinical and Experimental Immunology*, v. 153, p. 324–330, 2008.

LOOD, C *et al.* C1q inhibits immune complex-induced interferon-alpha production in plasmacytoid dendritic cells: a novel link between C1q deficiency and systemic lupus erythematosus pathogenesis. *Arthritis Rheum.* v. 60, n. 10, p. 3081-3090, 2009.

LUBAMBA, B.; DHOOGHE, B.; NOEL, S.; LEAL, T. Cystic fibrosis: insight into CFTR pathophysiology and pharmacotherapy. *Clinical biochemistry*. v. 45, p. 1132-44, 2012.

LUZ, G.S; CARVALHO, M.D.B; PELLOSO, S.M; HIGARASHI, I.H. Prevalência das Doenças Diagnosticadas pelo Programa de Triagem Neonatal em Maringá, Paraná, Brasil: 2001-2006. *Rev. Gaúcha Enferm*, v.29, n.3, p. 446-453, 2008.

LUZ, P.R, MIYAZAKI M, NETO N.C, NISHIHARA R.M, MESSIAS-REASON I.J. High levels of mannose-binding lectin are associated with the risk of severe cardiomyopathy in chronic Chagas Disease. *Int J Cardiol.* p.448 – 450, 2008.

MAGALHÃES, M.; BRITTO, M.C.A.; BEZERRA, P.G.M.; VERAS, A. Prevalência de bactérias potencialmente patogênicas em espécimes respiratórias de fibrocísticos do Recife. *J Bras Patology Med Lab*, v.40, n. 4, p 223-7, 2004.

MATSUSHITA, M.; FUJITA, T. Cleavage of the Third Component of Complement (C3) by Mannose-Binding Protein-Associated Serine Protease (MASP) with Subsequent Complement Activation. *Immunobiology*, v. 194, p. 443–448, 1995.

MESSIAS-REASON I.J.; BOLDT, A.B.; MORAES BRAGA, A.C.; VON ROSEN S, STAHLKE, E.; DORNELLES L, PEREIRA-FERRARI, L.; KREMSNER, P.G.; KUN, J.F.; The association between mannan-binding lectin gene polymorphism and clinical leprosy: new insight into an old paradigm. *J Infect Dis.* v.196, p.1379-8, 2007.

MIRANDA, K. A.; VASCONCELOS, L. R. S.; COELHO, L. C. B. B.; LIMA FILHO, J. L.; CAVALCANTI, M. S. M.; MOURA, P. High Levels of Serum Mannose-Binding Lectin are Associated with the Severity of Clinical Signs of Leptospirosis. *Braz J Med Biol Res*, v. 42, n.4, p. 353-357, 2009.

MISHRA, A.; GREAVES, R.; MASSIE, J. The relevance of sweat testing for the diagnostic of cystic fibrosis in the genomic era. *Clin Biochem Rev*, v. 26, p.135-153, 2005.

MORRAL, N.; LIEVADOT. R.; CASALS .T.; GASPARINI, P.; MACEK, M.; DÖRK, T.; ESTIVILL. X. Independent origins of cystic fibrosis mutations R334W, R347P, R1162X and 3849 10kbCT provide evidence of mutation recurrence in the CFTR gene. *Am J Hum Genet*, 55: 890-898, 1994.

MOSKOWITZ, S.M *et al.* Clinical practice and genetic counseling for cystic fibrosis and cftr-related disorders. *Genet Med*, v.10, n.12, p. 851-868, 2008.

MUHLEBACH, M. S.; MacDONALD, S. L.; BUTTON, B.; HUBBARD, J. J.; TURNER, M. L.; BOUCHER, R. C.; KILPATRICK, D. C. Association Between Mannan-Binding Lectin and Impaired Lung Function in Cystic Fibrosis May be Age-Dependent. *Clinical and Experimental Immunology*, v. 145, n.2, p. 302–307, 2006.

NISIHARA, R.M.; UTIYAMA, S.R.R.; OLIVEIRA, N.P.; MESSIAS-REASON, I.J. Mannan-binding lectin deficiency increases the risk of recurrent infections in children with Down's syndrome. *Hum Immunol* . v.71, p.63–66, 2010.

NTIMBANE, T; COMTE, B; MAILHOT, G; BERTHIAUME, Y; POITOUT, V; PRENTKI, M; RABASA – LHORET, R, LEVY, E. Cystic fibrosis-related diabetes: from *CFTR* dysfunction to oxidative stress. *Clin Biochem Rev*. v.30, p. 153-177, 2008.

OKROJ, M.; HEINEGARD, D.; HOLMDAHL, R.; BLOM, A. M. Rheumatoid arthritis and the complement system. *Ann Med*. v. 39, n. 7, p. 517-530, 2007.

OGDEN, C. A.; CATHELINEAU, A.; HOFFMANN, P. R.; BRATTON, D.; GHEBREHIWET, B.; FADOK, V. A.; HENSON, P. M. C1q and Mannose Binding Lectin Engagement of Cell Surface Calreticulin and CD91 Initiates Macropinocytosis and Uptake of Apoptotic Cells. *J Exp Med*, v. 194, n. 6, p. 781-95. 2001.

OLIVER, A.; ALARCÓN,T.; CABALLERO, E.; CANTÓN, R. Diagnóstico microbiológico de la colonización-infección broncopulmonar en el paciente con fibrosis quística. *Enferm Infec Microbiol Clin*. v. 27, n.2, p. 89-104, 2009.

OSBORNE, L *et al.* Incidence and expression of the N1303K mutation of the cystic fibrosis (CFTR) gene. *Hum. Genet*, v.89, n.6, 1992.

PRASAD, R.; SHARMA, H.; KAUR, G. Molecular basis of cystic fibrosis disease: an Indian perspective. *Ind J Clin Biochem*, v. 25, n.4, p.335–341

PEREIRA L, RASKIN S, FREUND AA, RIBAS PD, CASTRO RMV, PIGNATTI PF, *et al.* Cystic fibrosis mutations R1162X and 2183AA→G in two Southern Brazilian states. *Genet Mol Biol*, v.22, p.291-294, 1999.

PERETTI, N; MARCIL, V; DROWIN, E; LEVY, E. Mechanisms on lipid malabsorption in cystic fibrosis: the impact of essential fatty acids deficiency. *Nutr Metab*. v.2, p.11-28, 2005.

PÉREZ, M.M.; LUNA, MC.; OMAR H. PIVETTA, O.H.; KEYEUX, G. *CFTR* gene analysis in Latin American CF patients: Heterogeneous origin and distribution of mutations across the continent. *J Cyst Fibros*, n. 6, p. 194–208.

PERONE, C.; MEDEIROS, G.S.; DEL CASTILLO, D.M.; DE AGUIAR, M.J.B.; JANUÁRIO, J.N. Frequency of 8 *CFTR* gene mutations in cystic fibrosis patients in Minas Gerais, Brazil, diagnosed by neonatal screening. *Braz J of Medical and Biol Res*, v.43, p.134-8, 2010.

PUCHELLE, E.; BAJOLET, O.; ABELY, M. Airway mucus in cystic fibrosis. *Pediatr Resp Rev*. v. 3, p.115-119, 2002.

QU, H.; RICKLIN, D.; LAMBRIS, J. D. Recent developments in low molecular weight complement inhibitors. *Mol Immunol*. v. 47, n. 2-3, p. 185-195, 2009.

QUINTON, P.M. Physiological basis of cystic fibrosis: a historical perspective. *Physiol Rev*, v.79, suppl 1: S3-S22, 1999.

RASKIN, S. Estudo multicêntrico das bases da genética molecular e da epidemiologia da fibrose cística em populações brasileiras. Curitiba, 2001. Tese. Universidade Federal do Paraná.

RASKIN, S *et al.* High Allelic Heterogeneity Between Afro-Brazilians and Euro-Brazilians Impacts Cystic Fibrosis Genetic Testing. *Genetic testing*, v. 7, n. 3, p. 213 -218, 2003.

RASKIN,S.; FERRARI, L.P.; REIS, F.C.; ABREU, F.; MAROSTICA,P.; ROZOV., *et al.* Incidence of cystic fibrosis in five different states of Brazil as determined by screening of p.F508del, mutation at the *CFTR* gene in newborns and patients. *J Cyst Fibros*, v. 7, p. 15-22, 2008.

RASKIN, S.; PETAL-ERLER, M.L.; PHILLIPS, J.A.; FERRARI, L.P.; PROBST, C.M.; FAUCZ, F.R., *et al.* Cystic Fibrosis Gene Variability in Two Southern brazilian amerindian populations: Analysis of the Δ F508 mutation and the KM19 and XV2C Haplotypes. *Hum Biol*, v. 79, n.1, p. 79-91, 2007.

RASKIN, S.; PHILLIPS, J.A.; KRISHNAMANI, S.; VNENCAK-JONES,C.; PARKER,R.A.; ROZOV, T., *et al.* DNA analysis of cystic fibrosis in Brazil by direct PCR amplication from Guthrie cards. *Am J Med Genet*, v. 46, n.6, p. 669-9, 1993.

RATJEN, F e DORING, G. Cystic fibrosis. *Lancet*, v. 361, p.681-9, 2003.

REIS, F.J.C.; DAMACENO, N. Fibrose cística. *J Pediatr (Rio J)*, v. 74, n. suplemento 1, p. S76- S94, 1998.

RIBEIRO, J.D.; RIBEIRO, M.A.G.O.; RIBEIRO, A.F. Controvérsias na fibrose cística- do pediatra ao especialista. J. Pediatr (Rio J), v.78, supl.2, p. 171-186, 2002.

RIORDAN JR, ROMMENS JM, KEREM B, ALON N, ROZMAHEL R, GRZELCZAK Z, et al. Identification of the Cystic Fibrosis Gene: Cloning and Characterization of Complementary DNA. Science, v.245, p.1066-107, 1989.

RODRIGUES, R; GABETTA, C.S, PEDRO, K.P; VALDETARO F, FERNANDES M.I.M; MAGALHÃES, P.K.R, JANUÁRIO, J.N, MACIEL, L.M.Z. Cystic Fibrosis and Neonatal Screening. Cad Saúde Pública, v. 24, p. 475-84, 2008.

ROMAN, F. *et al.* Dynamics of long-term colonization of respiratory tract by *Haemophilus influenzae* in Cystic Fibrosis patients shows a marked increase in hypermutable strains. J Clin Microbiol, v.1, n. 42, p. 1450- 1459, 2004.

ROMMENS JM, IANNUZZI MC, KEREM B, DRUMM ML, HELMER G, DEAN M, et al. Identification of the Cystic Fibrosis Gene: Chromosome Walking and Jumping. Science, v.245, p.1059-65, 1989.

ROWE S.M; MILLER, S; SORSCHER, E.J. Cystic Fibrosis. N Engl J Med, v.352, n. 19, p 1992-2005.

ROWNTREE, R.K. E HARRIS, A. The phenotypic consequences of *CFTR* mutations. Annals of human genetics, n. 67, p. 471-85, 2003.

SCHAFRANSKI MD, PEREIRA-FERRARI L, SCHERNER D, TORRES R, JENSENIUS JC, MESSIAS-REASON IJ. High-producing MBL2 genotypes increase the risk of acute and chronic carditis in patients with history of rheumatic fever. Mol Immunol. v. 45, p.3827-31, 2008.

SCHAFRANSKI MD, STIER A, NISHIHARA RM, MESSIAS-REASON IJ. Significantly increased levels of mannose-binding lectin (MBL) in rheumatic heart disease: a beneficial role for MBL deficiency. Clin Exp Immunol. v. 138, p.521-5, 2004.

SANTOS, G.P.C.; DOMINGOS, M.T.; WITTIG, E.O.; RIEDI, C.A.; ROSÁRIO, N.A. Programa de Triagem Neonatal para Fibrose Cística no Estado do Paraná: Avaliação após 30 meses de sua Implantação. J Pediatr (Rio J). 2005; 81: 240-4.

SARMA, J. V.; WARD, P. A. The complement system. Cell Tissue Res. v. 343, n. 1, p. 227-235, 2011.

SEYFARTH, J.; GARRED, P.; MADSEN, H. O. The 'Involution' of Mannose Binding Lectin. Hum Mol Genet, v. 14, n. 14, p. 2859-2869. 2005.

SILVA, W. D. da; MOTA, I. *Imunologia Basica e Aplicada*. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003.

SIMS, E.J.; McCORMICK, J.; MRCPCH; MEHTA, G.; PHILL, M.; MEHTA, A. Neonatal Screening For Cystic Fibrosis is Beneficial even in the context of modern treatment. *J Pediatr*, v. 147, p. S42-S46, 2005.

SHARON, N. Lectins: Past, Present and Future. *Biochemical Society Transactions*, v. 36, n. 6, p. 1457–1460. 2008.

STRAUSBAUG, S.D.; DAVIS, P.B. Cystic Fibrosis: A review of epidemiology and pathobiology. *Clin Chest Med*, v. 28, p.279- 288, 2007.

SOUTHERN, K.M.; MÉRELLE, M.M.E.; DANKERT-ROELSE, J.E.; NAGELKERKE, A. Newborn screening for cystic fibrosis. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, Issue 1, 2009.

SOUZA, H.A.P.H.M.; NOGUEIRA, K.S.; MATOS, A.P.; VIEIRA, R.P.; RIEDI, C.A.; ROSÁRIO, N.A. Early microbial colonization of cystic fibrosis patients identified by neonatal screening, with emphasis on *Staphylococcus aureus*. *J Pediatr (Rio J)*, v.82, n.5, p.377-382, 2006.

TAKAHASHI, M.; IWAKI, D.; KANNO, K.; ISHIDA, Y.; XIONG, J.; MATSUSHITA, M.; ENDO, Y.; MIURA, S.; ISHII, N.; SUGAMURA, K. FUJITA, T. Mannose-Binding Lectin (MBL)-Associated Serine Protease (MASP) -1 Contributes to Activation of the Lectin Complement Pathway. *J Immunol*, v. 180, n.9, p. 6132-6138, 2008.

TAYLOR, M. E.; BRICKETL, R. M.; CRAIG, R. K.; SUMMERFIELD, J. A. Structure and Evolutionary Origin of the Gene Encoding a Human Serum Mannose Binding Protein. *Biochem J*, v. 262, p. 763-771, 1989.

TSUI, L.C. The cytic fibrosis transmembrane conductance regulator gene. *Am J Respir Crit Care Med*, n.151, p. 47-53, 1995.

TERAI, I; KOBAYASHI, K; MATSUSHITA, M; MIYAKAWA, H; MAFUNE, N; H, KIKUTA. Relationship between gene polymorphisms of mannose-binding lectin (MBL) and two molecular forms of MBL. *Eur J Immunol*, v.33, n.10, 2003.

TRINDADE, J. M. F., DANTAS, A. T., DUARTE, A. L. B. P., MARQUES, C. D. L. O Sistema Complemento. *Temas de Reumatologia Clínica*, v. 9, n. 1, p.17-23, Março. 2008.

TURNER MW. Mannose-binding lectin: the pluripotent molecule of the innate immune system. *Immunol Today*, v.17, p.532-40, 1996

TURNER, M. W.; DINAN, L.; HEATLEY, S.; JACK, D. L.; BOETTCHER, B.; LESTER, S.; MCCLUSKEY, J.; ROBERTON, D. Restricted Polymorphism of the

Mannose-Binding Lectin Gene of Indigenous Australians. *Hum Mol Genet*, v. 9, n. 10, p. 1481-1486. 2000.

TURNER, M.W. The Role of Mannose-Binding Lectin in Health and Disease. *Mol Immunol*, v. 40, p. 423-429. 2002.

TURNER MW. The role of mannose binding lectin in health and disease. *Mol Immunol*, v.40, p. 423-9, 2003.

TIZZANO EF, BUCHWALD M. Cystic Fibrosis: Beyond the gene to therapy. *J. Pediatr*, v.120, n.3, p. 337-349, 1992.

WALPORT, M. J. Complement. First of two parts. *N Engl J Med*. v. 344, n. 14, p. 1058-1066, 2001.

WANG, Z. Y.; MORINOBU, S.; KANAGAWA, S.; KUMAGAI, S. Polymorphisms of the Mannose Binding Lectin Gene in Patients with Sjogren's Syndrome. *Annals of the Rheumatic Diseases*, v. 60, n. 5, p. 483-486, 2001.

VALLINOTO, A. C. R.; MUTO, N. A.; ALVES, A. E. M.; MACHADO, L. F. A.; AZEVEDO, V. N.; SOUZA, L. L. B.; ISHAK, M. O. G.; ISHAK, R. Characterization of Polymorphisms in the Mannose-Binding Lectin Gene Promoter Among Human Immunodeficiency Virus 1 Infected Subjects. *Memorial Instituto Oswaldo Cruz*, v. 103, n. 7, p. 645-649, 2008.

VARDAR, F.; PEHLIVAN, S.; ONAY, H.; ATLYHAN, F. GÜLİZ, N.; ÖZKÝNAY, C.; ÖZKÝNAY, F. Association Between Mannose Binding Lectin Polymorphisms and Predisposition to Bacterial Meningitis. *The Turkish Journal of Pediatrics*, v. 49, n. 3, p. 270-273, 2007.

YANG, I. A.; SEENEY, S. L.; WOLTER, J. M.; ANDERS, E. M.; McCORMACK, J. G.; TUNNICLIFFE, A. M.; RABNOTT, G. C.; SHAW, J. G.; DENT, A. G.; KIM, S. T.; ZIMMERMAN, P. V.; FONG, K. M. Mannose-Binding Lectin Gene Polymorphism Predicts Hospital Admissions for COPD Infections. *Genes and Immunity*, v. 4, p. 269–274, 2003.


YARDEN, J.; RADOJKOVIC, D.; BOECK, K.; MACEK, JR. M.; ZEMKOVA, D.; VAVROVA, V.; VLIETINCK, R.; CASSIMAN, J. J.; CUPPENS, H. Polymorphisms in the Mannose Binding Lectin Gene Affect the Cystic Fibrosis Pulmonary Phenotype. *J Med Genet*, v. 41, p. 629–633, 2004.

ZIELENSKI, J. Genotype and phenotype in cystic fibrosis. *Respiration*, v. 67, n.2, p. 117-33, 2000.

ZIELENSKI, J. E TSUI, L.C. Cystic fibrosis: genotypic and phenotypic variations. *Annual review of genetics* ,v. 29, p. 777-807, 1995.

ANEXOS

Anexo 1 – Parecer de Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná



Curitiba, 10 de dezembro de 2009.

Ilmo (a) Sr. (a)
Danieli Isabel Romanovitch Ribas
Neste

Prezada Pesquisadora:

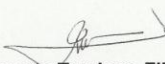
Comunicamos que o Projeto de Pesquisa intitulado “ESTUDO MOLECULAR DO GENE CFTR E GENES MODIFICADOS DA DOENÇA PULMONAR EM PACIENTES TRIADOS PARA FIBROSE CÍSTICA”, foi analisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos, em reunião realizada no dia 24 de novembro de 2009. O referido projeto atende aos aspectos das Resoluções CNS 196/96, e demais, sobre Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisa Envolvendo Seres Humanos do Ministério da Saúde.

CAAE: 0296.0.208.000-09
Registro CEP: 2079.246/2009-11

Conforme a Resolução 196/96, solicitamos que sejam apresentados a este CEP, relatórios sobre o andamento da pesquisa, bem como informações relativas às modificações do protocolo, cancelamento, encerramento e destino dos conhecimentos obtidos.

Data para entrega do primeiro relatório: 09 de junho de 2010.

Atenciosamente,



Renato Tambara Filho
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
em Seres Humanos do Hospital de Clínicas/UFPR

APÊNDICES

Apêndice 1 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

Título do Projeto: Estudo molecular do gene CFTR e genes modificadores da doença pulmonar em pacientes triados para Fibrose Cística

Investigador (s): Carlos Antônio Riedi, Danieli Isabel Romanovitch Ribas, Lilian Pereira Ferrari, Liya Regina Mikami e Nelson Rosário.

Local da Pesquisa: Laboratório de Genética e de Imunologia Clínica das Faculdades Integradas do Brasil – UNIBRASIL Curitiba – Pr e Ambulatório de Pediatria do Hospital de Clínicas da UFPR.

Seu filho ou menor sob sua responsabilidade está sendo convidado (a) a participar de uma pesquisa, coordenada por um profissional de saúde agora denominado pesquisador. Para poder participar, é necessário que você leia este documento com atenção. Ele pode conter palavras que você não entende. Por favor, peça aos responsáveis pelo estudo para explicar qualquer palavra ou procedimento que você não entenda claramente.

O propósito deste documento é dar a você as informações sobre a pesquisa e, se assinado, dará a permissão para seu filho ou menor sob sua responsabilidade participar no estudo.

O estudo denomina-se **Estudo molecular do gene CFTR e genes modificadores da doença pulmonar em pacientes triados para Fibrose Cística** e tem como objetivo realizar a avaliação genética do gene da fibrose cística (CFTR), e de genes modificadores em relação ao comprometimento pulmonar em crianças com fibrose cística triadas ao nascer. Farão parte deste estudo crianças de ambos os gêneros, pertencentes ao programa de triagem neonatal do Hospital de Clínicas do Paraná. Crianças que apresentem níveis elevados de tripsina comprovados pela realização de dois testes do pezinho positivos e teste de suor positivo. Serão excluídos deste estudo indivíduos que apresentem teste de suor negativo associado a um teste de tripsina positivo.

O benefício deste estudo será de elucidar o agravamento do comprometimento pulmonar de crianças com fibrose cística, proporcionando desta forma aumento da qualidade vida, diminuição das infecções e conseqüentemente aumento da sobrevida dos pacientes com Fibrose Cística.

Para análise genética do gene da fibrose cística e dos genes modificadores relacionados à função pulmonar, será necessário realizar coleta de 10 mL de amostra sanguínea da criança, por meio, de agulhas de calibre 21 ou 23 (0,8 ou 0,7mm) indicadas para uso em crianças ou adultos com veias finas, como serão coletada amostra de sangue para a realização do estudo, poderá ocorrer pós coleta formação de hematoma o qual não causará nenhum risco ou desconforto para a mesma.

Como a criança não precisará sair do ambiente hospitalar para a realização da coleta de sangue, e esta pesquisa é sem fins lucrativos, todos os

envolvidos estão isentos de custos e de ressarcimentos. Cabe salientar que a participação no estudo é voluntária e você poderá suspender a participação da criança a qualquer momento, sem que isso venha a prejudicá-lo.

Quanto aos dados que serão obtidos nesse estudo, podemos garantir que são totalmente confidenciais e jamais serão divulgados com o nome do participante. Os dados de identificação serão mantidos em sigilo, com uso apenas das iniciais do nome ou outra codificação. Os dados coletados serão usados para a avaliação do estudo. Membros das Autoridades de Saúde ou do Comitê de Ética, podem revisar os dados fornecidos. Os dados também podem ser usados em publicações científicas sobre o assunto pesquisado. Porém, a identidade da criança não será revelada em qualquer circunstância. As únicas pessoas que terão acesso aos dados do seu filho são os pesquisadores.

ESCLARECIMENTOS E DÚVIDAS

Se você ou seus parentes tiver (em) alguma dúvida com relação ao estudo, direitos do paciente, ou no caso de danos relacionados ao estudo, você deve contatar o Investigador do estudo ou sua equipe: Carlos Antônio Riedi (41-33601800), Danieli Isabel Romanovitch Ribas (41- 99278067), Lilian Pereira Ferrari (41-96525652), Liya Regina Mikami (41-99710706), Nelson Rosário (41-91015181). Se você tiver dúvidas sobre seus direitos como um paciente de pesquisa, você pode contatar Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (CEP) do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, pelo telefone: 3360-1896. O CEP trata-se de um grupo de indivíduos com conhecimento científicos e não científicos que realizam a revisão ética inicial e continuada do estudo de pesquisa para mantê-lo seguro e proteger seus direitos.

DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO DO PACIENTE

Para que seu filho e ou o menor sob sua responsabilidade possa participar, é necessário que a autorização abaixo seja assinada.

Declaro que eu li e discuti com o investigador responsável pelo presente estudo os detalhes descritos neste documento. Entendo que eu sou livre para aceitar ou recusar a participação do meu filho ou menor sob minha responsabilidade, e que eu posso interromper a participação dele a qualquer momento sem dar uma razão. Eu concordo que os dados coletados para o estudo sejam usados para o propósito acima descrito. Eu entendi a informação apresentada neste termo de consentimento. Eu tive a oportunidade para fazer perguntas e todas as minhas perguntas foram respondidas. E eu receberei uma cópia assinada e datada deste Documento de Consentimento Informado. Declaro também não possuir nenhum grau de dependência profissional com o pesquisador e que a participação do meu filho é voluntária. E diante disso eu _____ portador do RG _____, abaixo assinado autorizo a participação do meu filho _____.

Assinatura dos pais e/ou responsável legal

Curitiba, _____ de _____ de _____.

Assinatura do Pesquisador Responsável

Curitiba, _____ de _____ de _____.

Apêndice 2 - Dados referentes a idade, gênero, níveis de MBL e mutações do gene *CFTR* grupo pacientes

PACIENTES	IDADE (meses)	GÊNERO	NÍVEIS DE MBL	MUTAÇÕES CFTR
FC 01	26	F	850	<i>p.Gly542X / X</i>
FC 02	54	M	375	<i>p.phe508del / p.phe508del</i>
FC 03	56	M	3000	<i>p.phe508del / p.Gly542X</i>
FC 05	98	F	1275	<i>p.phe508del / p.phe508del</i>
FC 06	14	F	3700	<i>p.phe508del / p.Gly542X</i>
FC 08	24	F	3650	<i>p.phe508del / p.phe508del</i>
FC 09	48	M	100	<i>p.Gly542X / p.Lys684serfsX38</i>
FC 10	93	M	100	<i>p.Gly542X / X</i>
FC 12	25	M	4050	<i>p.Gly542X / p.Asn1303Lys</i>
FC 13	14	F	3100	<i>p.phe508del / X</i>
FC 14	65	M	450	<i>p.phe508del / p.phe508del</i>
FC 15	5	F	100	<i>p.phe508del / p.phe508del</i>
FC 16	92	F	450	<i>p.Asn1303Lys / p.Asn1303Lys</i>
FC 17	63	M	3000	<i>p.phe508del / X</i>
FC 20	27	F	1850	<i>p.phe508del / p.Gly542X</i>
FC 21	95	F	100	<i>p.phe508del / p.Gly542X</i>
FC 22	25	F	3200	<i>p.phe508del / p.phe508del</i>
FC 23	67	M	2850	<i>p.Gly542X / p.Asn1303Lys</i>
FC 25	8	M	100	<i>p.Gly542X / X</i>
FC 26	54	M	100	<i>p.phe508del / p.phe508del</i>
FC 27	19	M	725	<i>p.phe508del / X</i>
FC 29	24	F	3825	<i>p.phe508del / X</i>
FC 30	67	M	2075	<i>X / X</i>
FC 32	71	F	1525	<i>p.phe508del / X</i>
FC 34	115	M	100	<i>p.phe508del / p.Gly542X</i>
FC 35	73	F	850	<i>p.phe508del / X</i>
FC 37	39	F	1575	<i>p.Gly542X / X</i>
FC 38	106	F	150	<i>p.Gly542X / X</i>
FC 39	92	F	3400	<i>p.Gly542X / p.Gly542X</i>
FC 40	106	M	2100	<i>p.Gly542X / p.Asn1303Lys</i>
FC 41	86	M	2350	<i>p.ArG1162X / p.ArG1162X</i>
FC 43	29	M	725	<i>p.arG1162X / p.ArG1162X</i>
FC 44	68	F	3300	<i>p.phe508del / p.phe508del</i>
FC 45	24	M	2975	<i>p.phe508del / p.phe508del</i>
FC 46	62	M	1975	<i>p.Gly542X / p.Asn1303Lys</i>
FC 47	26	F	550	<i>p.Gly542X / p.Lys684serfsX38</i>
FC 48	51	M	100	<i>p.Lys684serfsX3883 / X</i>

FC 49	69	M	800	<i>p.phe508del / p.phe508del</i>
FC 50	27	F	1250	<i>p.phe508del / X</i>
FC 51	66	M	2475	<i>p.GLy542X / p.GLy542X</i>
FC 52	57	M	100	<i>p.GLy542X / p.Asn1303Lys</i>
FC 53	20	F	100	<i>p.GLy542X / X</i>
FC 54	74	F	2900	<i>p.phe508del / p.Lys684serfsX38</i>
FC 56	39	F	2350	<i>p.GLy542X / p.Asn1303Lys</i>
FC 57	96	F	1850	<i>p.Asn1303Lys / X</i>
FC 58	51	F	100	<i>p.phe508del / p.phe508del</i>
FC 59	9	F	3750	<i>p.phe508del / p.GLy542X</i>
FC 60	96	F	3800	<i>p.phe508del / p.Lys684serfsX38</i>
FC 61	22	F	100	<i>p.phe508del / p.GLy542X</i>
FC 62	56	F	1850	<i>p.phe508del / p.GLy542X</i>
FC 63	76	F	500	<i>p.GLy542X / X</i>

Apêndice 3 – Dados referentes as manifestações clínicas do grupo paciente

PACIENTES	PNEUMONIA	IVAS	Tosse Produtiva	Tosse seca	Baqueteamento	Dispneia	Tiragem
FC 01	não	sim	sim	sim	não	não	não
FC 02	não	sim	não	sim	não	não	não
FC 03	não	não	sim	sim	sim	sim	sim
FC 05	não	sim	sim	sim	sim	sim	sim
FC 06	não	não	sim	sim	não	sim	não
FC 08	não	sim	sim	não	não	não	não
FC 09	não	sim	não	não	não	não	não
FC 10	não	não	sim	não	não	sim	não
FC 12	não	não	sim	não	não	não	não
FC 13	sim	sim	sim	sim	não	não	não
FC 14	não	não	sim	não	não	não	não
FC 15	não	não	não	não	não	não	não
FC 16	sim	sim	sim	não	sim	não	não
FC 17	não	não	sim	não	sim	não	não
FC 20	não	não	não	não	não	não	não
FC 21	não	não	sim	sim	não	não	não
FC 22	não	não	sim	não	não	não	não
FC 23	não	sim	sim	sim	nao	nao	sim
FC 25	não	não	sim	sim	não	sim	sim
FC 26	não	não	sim	não	não	sim	não
FC 27	não	não	sim	não	não	não	não
FC 29	sim	não	nao	sim	nao	nao	nao
FC 30	não	não	sim	sim	não	sim	sim
FC 32	não	sim	sim	sim	não	não	não
FC 34	não	sim	sim	sim	não	não	não
FC 35	não	sim	não	não	não	não	não
FC 37	não	sim	sim	não	não	sim	nao
FC 38	não	não	sim	não	sim	sim	não
FC 39	não	não	sim	sim	não	não	não
FC 40	não	não	sim	não	não	não	não
FC 41	não	sim	sim	sim	sim	não	não
FC 43	não	não	sim	nao	nao	sim	sim
FC 44	não	sim	sim	não	não	não	não
FC 45	não	não	sim	sim	não	não	não
FC 46	não	sim	sim	não	não	não	não
FC 47	não	sim	sim	nao	nao	nao	nao
FC 48	não	sim	sim	não	não	não	não

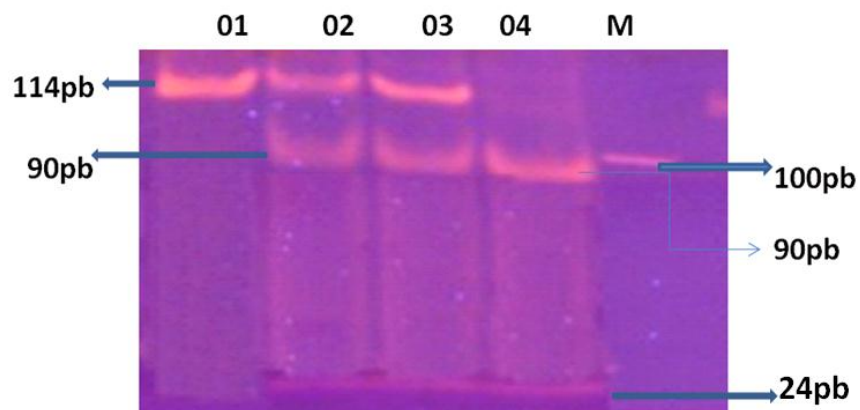
FC 49	não	não	sim	não	não	não	não
FC 50	sim	sim	sim	não	não	não	não
FC 51	não	não	sim	não	não	não	não
FC 52	não	não	sim	sim	não	não	não
FC 53	não	não	sim	não	não	não	sim
FC 54	não	não	não	não	não	não	não
FC 56	não	sim	sim	sim	nao	nao	nao
FC 57	não	não	sim	não	não	não	não
FC 58	não	não	sim	não	não	não	não
FC 59	não	não	não	não	não	não	não
FC 60	sim	sim	não	não	não	não	não
FC 61	não	sim	sim	sim	não	não	não
FC 62	não	sim	não	não	não	não	não
FC 63	sim	sim	sim	não	não	não	não

Apêndice 3 – Dados referentes a microbiota do escarro

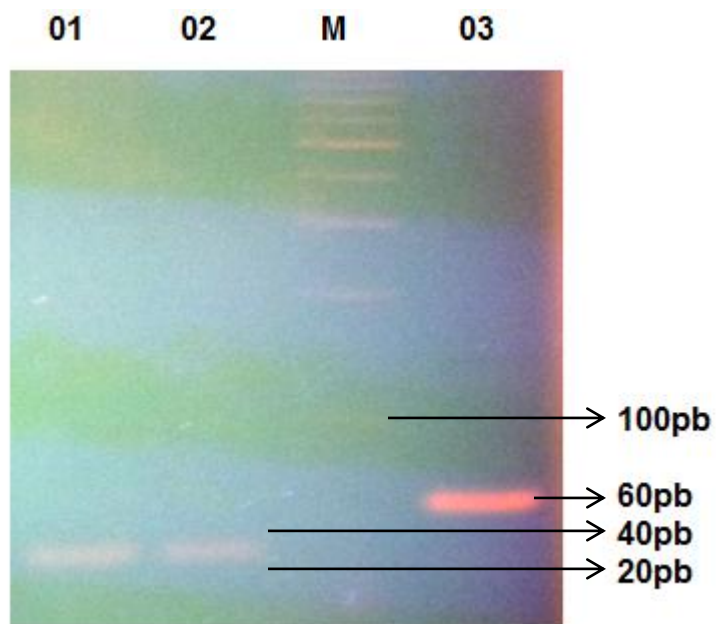
PACIENTES	<i>S.aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>H.influenza</i>	<i>cBc</i>	<i>outras</i>
FC 01	sim	não	sim	sim	não
FC 02	sim	sim	sim	não	não
FC 03	sim	sim	não	não	sim
FC 05	sim	não	não	sim	sim
FC 06	não	não	não	não	não
FC 08	sim	sim	não	não	sim
FC 09	sim	não	sim	não	não
FC 10	sim	sim	sim	não	não
FC 12	sim	não	sim	não	não
FC 13	sim	não	não	não	não
FC 14	não	sim	não	não	não
FC 15	não	não	não	não	não
FC 16	sim	sim	sim	não	sim
FC 17	sim	sim	sim	sim	não
FC 20	sim	não	sim	não	não
FC 21	sim	não	sim	não	não
FC 22	sim	sim	sim	não	sim
FC 23	sim	sim	não	não	não
FC 25	não	não	não	não	não
FC 26	sim	não	sim	não	não
FC 27	não	não	não	não	não
FC 29	sim	sim	sim	não	sim
FC 30	não	sim	não	sim	sim
FC 32	sim	sim	sim	não	não
FC 34	sim	sim	sim	não	sim
FC 35	sim	não	não	não	não
FC 37	sim	sim	sim	sim	não
FC 38	sim	não	sim	não	não
FC 39	sim	sim	sim	não	não
FC 40	sim	não	sim	não	não
FC 41	sim	sim	sim	não	não
FC 43	sim	sim	sim	sim	não
FC 44	sim	sim	sim	sim	não
FC 45	sim	não	sim	não	não
FC 46	sim	sim	sim	não	não
FC 47	não	sim	sim	não	sim
FC 48	sim	sim	sim	não	não

FC 49	não	não	sim	não	não
FC 50	sim	não	sim	não	não
FC 51	sim	sim	não	não	sim
FC 52	sim	sim	não	sim	não
FC 53	sim	sim	não	não	sim
FC 54	não	sim	não	não	sim
FC 56	sim	não	sim	não	não
FC 57	sim	não	não	não	não
FC 58	sim	sim	sim	não	não
FC 59	não	não	não	não	não
FC 60	sim	sim	sim	não	não
FC 61	sim	sim	não	não	não
FC 62	sim	não	sim	não	não
FC 63	sim	não	sim	não	sim

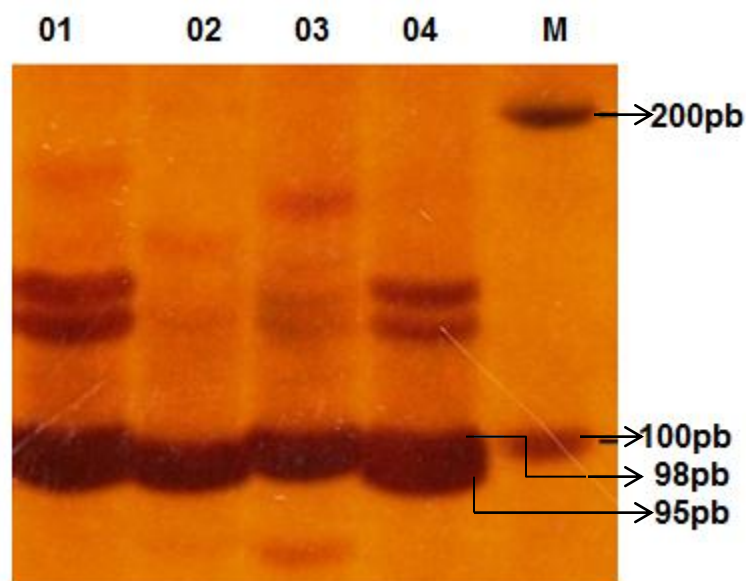
Apêndice 3 – Eletroforese das mutações do gene *CFTR*, *p.Gly542X* e *p.Asn1303lys*



Gel de Poliacrilamida 12% corado com brometo de etídio. Poço 01 - homozigoto para *p.Gly542X*, com padrão de banda em 114 pb. Poços 02 e 03 – heterozigotos, com padrão de 114, 90, 24pb. Poço 04 - indivíduo sem presença da *p.Gly542X*, com padrão de banda de 90 e 24pb. Poço M - marcador de peso molecular de 100 pb.



Gel de Poliacrilamida 12% corado com brometo de etídio. Poço 01 e 02 – heterozigotos com padrão de banda em 40 e 20 pb. Poço 03 – homozigoto, com padrão de banda em 60pb. Poço M - marcador de peso molecular de 100 pb.

Apêndice 4 – Eletroforese das mutações do gene *CFTR* *p.phe508del*

Gel de Poliacrilamida 12% corado por Nitrato de Prata. Poço 01 e 04 – heterozigotos com padrão de banda de 95 e 98pb. Poço 02 homozigoto com padrão de banda de 95pb. Poço 3 – indivíduo sem a mutação *p.phe508del*, com padrão de banda de 98pb. Poço M - marcador de peso molecular de 100 pb.